



Superoxyde réductase : Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse.

Florence Bonnot

► To cite this version:

Florence Bonnot. Superoxyde réductase : Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00470411

HAL Id: tel-00470411

<https://theses.hal.science/tel-00470411>

Submitted on 6 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier-Grenoble I
Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

THESE

présentée par

Florence BONNOT

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Spécialité : Chimie Biologie

Superoxyde réductase : Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse

Soutenance le 25 Novembre 2009 devant le jury composé de :

Pr. Sandrine BOSCHI-MULLER, rapporteur

Pr. Peter FALLER, examinateur

Pr. Marc FONTECAVE, président de jury

Dr. Vincent NIVIERE, directeur de thèse

Pr. Olivia REINAUD, rapporteur

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe Biocatalyse dans le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux dirigé par le Pr. Marc Fontecave, au CEA Grenoble. Je tiens à lui manifester toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. De plus, j'ai été honorée qu'il accepte d'être le Président de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Vincent Nivière, qui m'a encadrée durant cette thèse. Je le remercie pour nos nombreuses discussions scientifiques. Au travers de ces échanges, il m'a permis une compréhension approfondie des divers aspects du sujet et m'a appris à travailler avec rigueur et pertinence. Je le remercie aussi de m'avoir fait confiance et laissé une marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Ces trois années n'ont fait qu'accentuer mon intérêt pour la recherche. Enfin merci pour ton humanité, je garde un souvenir amusé de nos discussions sur Marseille, la politique ou le monde à cinq heures du matin, dans le train pour Paris.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ma thèse : le Pr. Sandrine Boschi-Muller, le Pr. Peter Faller, le Pr. Marc Fontecave et le Pr. Olivia Reinaud.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont travaillé avec moi de près ou de loin au cours de ces trois années de thèses et qui ont toutes pris le temps de m'écouter, de m'expliquer et de m'aider.

Je remercie le Dr. Stéphane Ménage du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux pour son aide dans les expériences de sulfoxydation et de RPE ainsi que pour ses discussions scientifiques, notamment en chimie inorganique. Tu as su me montrer la place primordiale de l'imagination dans le travail de recherche. Ta « poulette » ou encore « belles cuisses » te remercie !

Je remercie le Dr. Vincent Artero du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux pour m'avoir aidée à réaliser la synthèse des composés $\text{Fe}(\text{CN})_x(\text{CO})_y$. Merci d'avoir su te mettre à mon niveau, d'avoir toujours répondu à mes questions et même plus.

Je remercie le Dr. Vincent Favaudon de l'Institut Curie d'Orsay et le Pr. Chantal Houée-Levin de l'Université d'Orsay pour leur assistance dans les expériences de radiolyse pulsée.

Je tiens à remercier également Adeline Jorge-Robin du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux pour son assistance dans les expériences de sulfoxydation. Merci également pour ton naturel et ta spontanéité, ils sont parfois si rafraîchissants.

Je remercie le Dr. Dominique Bourgeois et le Dr. Philippe Carpentier du Laboratoire de l'IBS Grenoble pour les expériences de résonance Raman et d'absorbance à basse température réalisées au Cryobench.

Je remercie Colette Lebrun du CEA Grenoble et Izabel Bérard de l'IBS Grenoble pour les analyses de masse. Je remercie également le Dr. Catherine Berthomieu du CEA Cadarache pour

les expériences d'Infra-Rouge, le Dr. Serge Gambarelli du Service du CEA Grenoble pour son aide en RPE à basse température et le Dr. André Vermeglio du CEA Cadarache pour les expériences de photolyse éclair.

Je remercie également les personnes avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui ont été présentes lorsque j'avais une petite question dans leur domaine de compétence : Vincent Forge pour la fluorimétrie, Olivier Sénèque pour le stopped flow et John Willison pour l'oxymètre.

Je tiens également à remercier Emilie, ma SORette ! La situation n'était pas idéale mais on a toujours pu compter l'une sur l'autre. J'ai partagé avec toi plus qu'une protéine. Ta gentillesse et ton sourire sont loin de n'être que légende!

Merci aussi à toi Simon D, digne successeur des SOReuses ! On ne s'est croisé que quelques mois mais ce fut un réel plaisir. Continue à prendre la vie comme elle vient et allez l'OM... et l'OL ;-)

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire pour toute l'humanité et l'amitié qu'ils m'ont apportées.

Merci à tous, chimistes ou biochimistes (Olivier, Fabien, Sandrine, Hamid, Etienne, Cathy, Murielle, Stéphane T, Nico et Caroline), pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir et pour les moments de détente au café. Merci aussi à Nathalie pour ta disponibilité et ton efficacité et à toi, Chantal, pour ta joie de vivre.

Et je ne peux terminer ces remerciements sans un très grand merci à Sigolène, pour tes blablas interminables mais toujours appréciés, à Simon A, pour ta nonchalance et ta joie de vivre... un mélange surprenant mais appréciable, à Adeline L, pour ton dynamisme et ton sourire, à Silke, pour ta gentillesse, à Pierre-André, pour nous montrer que quand on veut on peut ! à Carole, pour l'assistance purif 24/24, à Phong, pour nous avoir fait partager les joies d'un jeune papa, à Vincent F, pour tes pauses thés, à Frédéric, Mohamad et Elodie, pour les bons moments passés au labo. J'ai aussi une pensée pour tous ceux qui ont déjà quitté le laboratoire : Alexia, Maïté, Eric, Guni, Aziz, Carine, Cécile et Pierre. Merci à tous d'avoir su faire vivre ce laboratoire.

Pour faire une bonne thèse il est indispensable d'être bien entourée. Pour ça, je remercie mes amis, ma famille et tout particulièrement mes parents, mes sœurs et mon frère, pour leur soutien et leurs encouragements. J'ai une pensée tout particulière pour Noémie, qui est venue illuminer les derniers jours de ma thèse avec sa jolie frimousse.

Enfin, j'ai trouvé dans ce laboratoire bien plus que ce que j'étais venue y chercher... Un grand merci à toi, Pascal, d'être là... Toi qui vois toujours le bon côté des choses, qui positive toujours tout et qui a su faire de ces deux dernières années de thèse une très jolie tranche de vie, un très beau point de départ... et merci d'avoir mis ton génie de l'orthographe au service de cette thèse.

La science consiste à oublier ce qu'on croit savoir,
et la sagesse à ne pas s'en soucier.

Charles Nodier

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction générale 1

I. Le stress oxydant 3

A. Les espèces actives de l'oxygène et dommages cellulaires 3

1. Généralités 3

2. Le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ 5

Production de $O_2^{\cdot-}$ 5

Réactivité de $O_2^{\cdot-}$ 6

3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 8

Production de H_2O_2 8

Réactivité de H_2O_2 9

4. Le radical hydroxyle HO^{\cdot} 10

Production de HO^{\cdot} 10

Réactivité de HO^{\cdot} 10

1 Réactivité vis-à-vis de l'ADN 10

2 Réactivité vis-à-vis des membranes cellulaires 12

3 Réactivité vis-à-vis des protéines 12

5. L'oxygène singulet et l'ozone 12

B. Les systèmes anti-oxydants 13

1. Les enzymes anti-oxydantes 14

2. Les piègeurs de HO^{\cdot} 15

3. Régulation génétique des systèmes antioxydants 16

4. Le stress oxydant : un problème de santé majeur 18

II. La superoxyde réductase 19

A. Généralités sur la SOR 19

1. La découverte de la SOR 19

2. Le site actif 21

B. Les différentes classes de SOR	25
1. Les SORs de classe 1	26
2. Les SORs de classe 2	28
3. Les SORs de classe 3	29
C. Le cycle catalytique des SORs	30
1. Réaction avec $O_2^{\cdot -}$	30
2. L'intermédiaire Fe^{3+} -(hydro)peroxo	34
1 Caractéristiques structurales.....	34
2 Rôle du ligand cystéine	37
3 Réactivité des espèces de type Fe^{3+} -OOH.....	39
 Chapitre II : Matériels et méthodes	43
 I. Matériels Biologiques.....	45
A. Souches bactériennes.....	45
B. Vecteur de surexpression.....	45
C. Milieux de culture	46
 II. Méthodes de biologie moléculaire	47
A. Introduction d'ADN plasmidique dans <i>E. coli</i>	47
1. Préparation des cellules compétentes	47
2. Purification d'ADN plasmidique	47
3. Transformation des cellules compétentes	48
B. Mutagenèse dirigée	48
1. Choix des amorces	48
2. Amplification de plasmide	49
3. Analyse des produits PCR : gel d'agarose et séquençage.....	50
 III. Technique de Biochimie	50
A. Purification des protéines.....	50
1. Surexpression des protéines	50

2.	Préparation des extraits protéiques.....	51
3.	Etapas chromatographiques.....	52
4.	Bilan de la purification des SORs	53
B.	Analyses Biochimiques	53
1.	Dosage des protéines	53
2.	Electrophorèse SDS-PAGE	54
3.	Dosage de H ₂ O ₂ par la méthode HRP/LCV (HorseRadish Peroxidase/ Leuco Crystal Violet)	55
4.	Mesures d'activité enzymatique.....	55
1	Test d'activité NADPH-flavodoxine-oxydoréductase (Fpr)	55
2	Test d'activité flavine réductase (Fre).....	56
5.	Dosage de O ₂ par électrode de Clark.....	56
C.	Etudes d'oxydation et de réduction de la SOR.....	56
1.	Réduction des centres à fer de la SOR	56
2.	Oxydation des centres à fer de la SOR.....	57
IV.	Techniques Spectroscopiques	59
1.	Spectrophotométrie UV-visible.....	59
2.	Spectroscopie InfraRouge.....	60
3.	Spectroscopie de résonance Raman	61
4.	Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique	61
5.	Mössbauer	62
6.	Spectrométrie de Masse	63
7.	Fluorimétrie	64
8.	Test de sulfoxydation du thioanisole.....	64
 Chapitre III : Mécanisme de transfert d'électrons		
au site actif de la SOR.....		67
I.	Introduction.....	69

II. Rôle du Centre I dans les transferts d'électrons	71
A. Réduction par deux systèmes enzymatiques de <i>E. coli</i>	71
1. Réduction de la SOR par la Fpr	71
2. Réduction de la SOR par la Fre	75
B. Echange d'électrons entre les deux centres de la SOR de <i>D. baarsii</i>	78
1. Les échanges d'électrons Centre I-Centre II	78
2. Cinétique rapide sur les échanges d'électrons Centre I-Centre II	79
C. Mutant C13S	81
 III. Rôle de réductases de <i>E. coli</i> dans l'activité SOR <i>in vivo</i>	89
A. Rôle de la Fpr <i>in vivo</i>	89
B. Rôle de la Fre <i>in vivo</i>	90
 Chapitre IV : Mécanisme réactionnel de la SOR	
avec le superoxyde	95
 I. Effet photochimique	97
A. Un effet photochimique associé aux expériences de radiolyse pulsée	97
B. Les produits de la réaction	103
C. Propriétés photochimiques des intermédiaires réactionnels de la SOR	104
D. Une espèce Fe^{3+}-OOH à l'origine du phénomène photochimique ?	106
1. Expériences UV-visible à basse température	106
2. Expérience RPE à basse température	107
E. Conclusion sur l'effet photochimique	110

II. Nouveau mécanisme de la SOR.....	111
A. Conditions expérimentales.....	112
B. Formation du 1^{er} intermédiaire.....	113
C. Formation du 2nd intermédiaire et de l'espèce finale	114
1. Etude sur la SOR sauvage	114
1 Dépendance du k_2 au pH	114
2 Spectre du 2 nd intermédiaire.....	116
3 Formation des produits finaux de la réaction	119
2. Etude du mutant E47A	121
3. Dosage de H_2O_2 après réaction de la SOR avec $O_2^{\cdot-}$	123
4. Nouveau mécanisme en absence d'effet photochimique	124
D. Etude du mutant E114A	126
E. Conclusion.....	129
 III.Effets de la mutation K48I étudiés par radiolyse pulsée	 130
A. Formation du 1^{er} intermédiaire réactionnel	130
B. Formation des produits de la réaction avec $O_2^{\cdot-}$	132
C. Un nouvel intermédiaire réactionnel mis à jour	138
 IV.Propriétés des espèces Fe^{3+}-OOH.....	 143
A. Introduction	143
B. Formation de l'espèce Fe^{3+}-OOH au sein de la SOR K48I.....	143
C. Réactivité de l'espèce Fe^{3+}-OOH.....	146
1. Réaction de sulfoxydation par le mutant SOR K48I	146
2. Production de HO^{\cdot} ?.....	151
3. Conclusions et proposition de mécanisme de sulfoxydation.....	154
4. Conclusion sur la réaction entre la SOR K48I et $O_2^{\cdot-}$	156
5. Oxydation énantiosélective	157
6. Réaction d'oxydation du thioanisole avec le mutant E47A	158

Chapitre V : Etudes préliminaires sur d'autres propriétés du site actif de la SOR..... 161

I. Activité catalase du site actif de la SOR..... 163

II. Oxydation au cérium..... 165

Conclusions et Perspectives..... 169

Références Bibliographiques 175

Annexes..... 191

Annexe 1 : Mutant C13S de la SOR de *D. baarsii* 193

Annexe 2 : Capacité des extraits de *E. coli* \pm Fpr pour réduire la SOR..... 197

Annexe 3 : Inhibiteurs de la SOR (ferrocyanure et analogues) 201

Annexe 4 : L'influence du formiate dans les expériences de radiolyse pulsée..... 209

Annexe 5 : Calcul du spectre d'absorption de T₂ à pH 7.6..... 212

Annexe 6 : Dépendance de la constante de vitesse k_3 du mutant SOR K48I au pH..... 214

Annexe 7 : Rôle de la lysine chez la SOR de *T. pallidum* 216

Annexe 8 : Réduction de la SOR K48I par H₂O₂ 219

Annexe 9 : Article..... 222

Abréviations

ADN	:	acide désoxyribonucléique
APS	:	ammonium persulfate
ARN	:	acide ribonucléique
AS	:	activité spécifique
BET	:	bromure d'éthidium
Cyt P450	:	cytochrome P450
DFT	:	Density Functional Theory
Dfx	:	désulfoferrodoxine
DMSO	:	diméthylsulfoxyde
DO	:	densité optique
E.A.O	:	espèces actives de l'oxygène
EDTA	:	acide éthylène diamine tetra acétique
ENH	:	électrode normale à hydrogène
ESI	:	ionisation électrospray
FAD	:	flavine adénine dinucléotide
FMN	:	flavine mononucléotide
Fpr	:	NADPH-flavodoxine-oxydoréductase
Fre	:	flavine réductase
FTIR	:	Fourier Transformed InfraRed
Fur	:	ferric uptake regulator
GC	:	chromatographie en phase gazeuse
GPx	:	glutathion peroxydase
Grx	:	glutarédoxine
HDL	:	lipoprotéines de haute densité
HRP	:	HorseRadish Peroxidase
IPTG	:	isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
Kb	:	kilobase
k_{cat}	:	constante catalytique
kDa	:	kilo Dalton
K_m	:	constante de Michaelis
LB	:	milieu Luria-Broth
LCV	:	Leuco Crystal Violet

LDL	:	lipoprotéines de basse densité
Nlr	:	néelarédoxine
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	:	polymerase chain reaction
Rbr	:	rubrérythrine
Ribo	:	riboflavine
RPE	:	résonance paramagnétique électronique
Rub	:	rubrédoxine
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
SiR	:	sulfite réductase
SOD	:	superoxyde dismutase
SOR	:	superoxyde réductase
TAE	:	tampon Tris Acétate EDTA
TEMED	:	N, N, N', N'-Tétraméthyléthylène diamine
Tris	:	trishydroxyméthylaminométhane
U	:	unité enzymatique
UV	:	ultra violet
XO	:	xanthine oxydase

Chapitre I : **Introduction générale**

I. Le stress oxydant

La vie est apparue dans un monde anaérobie. Initialement donc, aucune pression sélective n'a poussé les organismes vivants à mettre en place des systèmes enzymatiques insensibles à l'oxygène. Peu à peu, la concentration de dioxygène a augmenté dans l'atmosphère et O_2 est apparu comme un véritable poison pour les cellules vivantes. Un grand nombre d'enzymes s'est révélés d'excellents réducteurs pour former des espèces partiellement réduites de l'oxygène, très toxiques et à l'origine de dommages cellulaires majeurs. Certains microorganismes ont alors acquis une tolérance à l'oxygène en se débarrassant de leurs voies métaboliques les plus sensibles et en développant des mécanismes de défense contre ces espèces réduites de l'oxygène. Ils ont aussi réussi à utiliser O_2 comme source d'énergie via le processus de respiration. Aujourd'hui, du fait de l'importance qu'a pris ce processus de respiration, O_2 est devenu absolument indispensable pour la vie des organismes vivants. Cependant, O_2 a conservé une part importante de sa toxicité cellulaire. La présence de l'efficacité des systèmes de détoxification contre ces espèces partiellement réduites de l'oxygène (superoxyde dismutases, catalases, peroxydases, superoxyde réductases) est donc primordiale pour la viabilité des cellules aérobies. Une insuffisance au niveau de ces systèmes de détoxification peut être à l'origine d'un certain nombre de maladies graves chez l'homme, souvent associées à des processus de dégénérescence cellulaire. La connaissance et la compréhension de ces mécanismes antioxydants constituent donc un enjeu majeur en biologie.

A. Les espèces actives de l'oxygène et dommages cellulaires

1. Généralités

L'oxygène possède une configuration électronique particulière, avec deux électrons non appariés de spins parallèles sur ses orbitales π^* (Figure 1). A cause de cette configuration, définie comme état triplet, l' O_2 est une molécule très peu réactive vis-à-vis des molécules organiques (Halliwell, 1990). Cependant, l'oxygène peut être activé par des étapes de réductions successives à un électron.

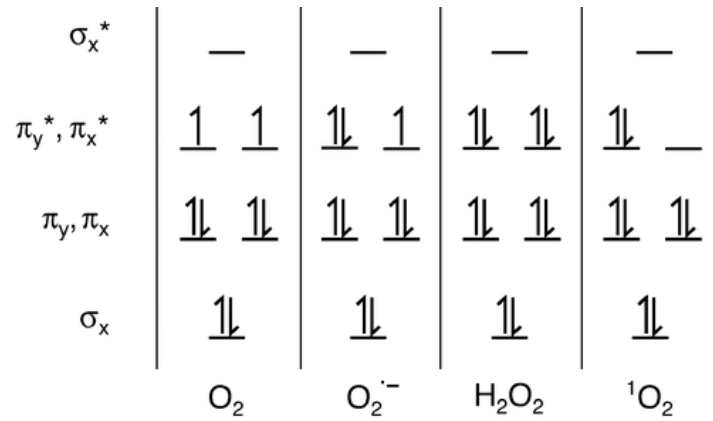


Figure 1 : Diagramme des orbitales moléculaires des molécules d'oxygène O_2 , de superoxyde $O_2^{\cdot -}$, d'hydrogène peroxyde H_2O_2 et d'oxygène singulet 1O_2 .

A partir de l'oxygène moléculaire, chaque réduction aboutit à la formation des espèces suivantes (Figure 2) : le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et sa forme protonée le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}), l'ion peroxyde (O_2^{2-}) et ses formes protonées l'anion hydroperoxyde (HO_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical $O^{\cdot -}$ et sa forme protonée le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et enfin O^{2-} et sa forme protonée, l'eau H_2O . $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 et HO^{\cdot} sont appelées espèces actives de l'oxygène (E.A.O.). Elles sont beaucoup plus réactives que l'oxygène car elles ne possèdent pas d'état triplet au niveau de leur configuration électronique (deux électrons non appariés avec des spins parallèles). Les équilibres thermodynamiques entre ces différentes espèces sont résumés dans la Figure 2.

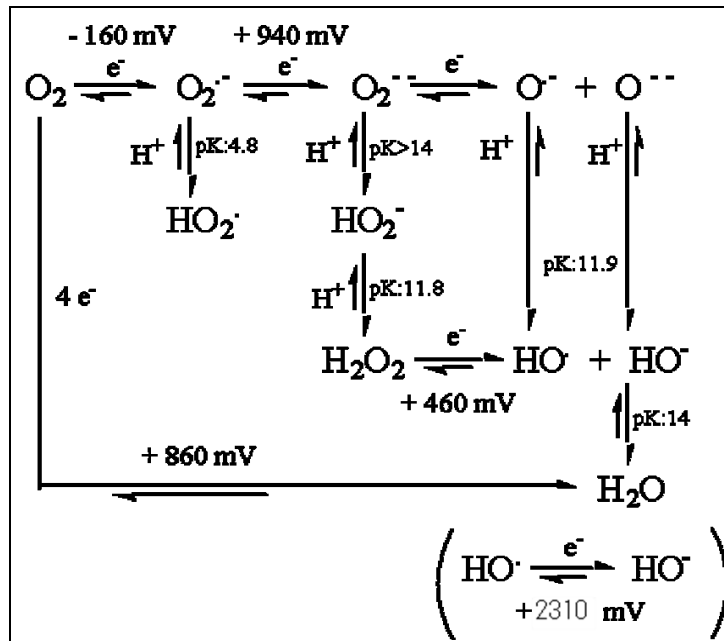


Figure 2 : Espèces activées de l'oxygène (E.A.O.) : transferts d'électrons et de protons (potentiels d'oxydoréduction par rapport à ENH à pH 7.0) (Pierre et Fontecave, 1999).

Les E.A.O. sont des sous-produits des métabolismes cellulaires (Messner et Imlay, 2002). Dans certains cas elles peuvent servir de messagers secondaires, tout particulièrement le peroxyde d'hydrogène qui en tant que molécule non chargée peut traverser les membranes (Forman, 2007). H_2O_2 est proposé comme messenger secondaire essentiellement chez les organismes supérieurs mais peut l'être également chez les procaryotes. Il interviendrait dans de nombreuses voies impliquant une signalisation redox, telles l'apoptose, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou encore l'agrégation plaquettaire (Stone et Yang, 2006). Des études ont montré que H_2O_2 est impliqué dans l'activation de l'activité enzymatique de tyrosines kinases et de sérine/thréonine kinases, telles les MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Forman, 2007). Certaines études proposent également le superoxyde comme messenger secondaire (Gardès-Albert et coll, 2003), mais son rôle direct comme agent de signalisation n'est pas encore clairement établi.

Les E.A.O. sont surtout connues en tant qu'espèces toxiques pour les organismes, pouvant conduire à des oxydations de macromolécules biologiques (ADN, protéines, sucres, lipides...) très dommageables pour les cellules. On parle alors de processus de stress oxydant lequel représente un problème biologique inévitable car la présence d'oxygène entraîne nécessairement la formation des E.A.O. Leur toxicité est en grande partie due à leur aptitude à induire la production du radical hydroxyde par la réaction de Fenton (Fenton, 1893 ; Wink et coll, 1994). Le radical HO^\bullet est, en effet, l'espèce la plus délétère des E.A.O.

C'est cet aspect de toxicité des E.A.O. qui sera principalement développé dans la suite de ce chapitre.

2. Le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$

Production de $O_2^{\bullet-}$

L'anion superoxyde est formé par la réduction monoélectronique de l'oxygène (Figure 2). Dans la cellule, le superoxyde est produit majoritairement au niveau de la chaîne respiratoire, chez les bactéries (Messner et Imlay, 1999) comme chez les organismes supérieurs (Babcock, 1999). Plusieurs éléments de la chaîne respiratoire peuvent laisser échapper des électrons qui vont réduire partiellement l'oxygène et produire du superoxyde. Il s'agit notamment des cytochromes de types b et du coenzyme Q (Messner et Imlay, 1999). Il a été estimé que chez la bactérie *Escherichia coli*, la formation de $O_2^{\bullet-}$ au niveau de la chaîne respiratoire représente 0.2 % de l'oxygène respiré (Imlay, 2003).

Le superoxyde peut aussi provenir de l'autooxydation de certaines petites molécules solubles, telles les flavines réduites (FMN et FAD), l'adrénaline et les molécules contenant des thiols (Messner et Imlay, 1999). Ces molécules peuvent réduire plus ou moins lentement O_2 en $O_2^{\bullet-}$, la présence d'ions métalliques catalysant généralement ces réactions (Messner et Imlay, 1999).

Le superoxyde peut aussi être généré par l'activité enzymatique des xanthines oxydases, des peroxydases et d'autres oxydases (McCord et Turrens, 1994). Les cytochromes P450 (Cyt P450) sont des monooxygénases qui catalysent des réactions d'hydroxylations, d'époxydations et de désalkylations de molécules organiques. Au cours de leur cycle catalytique, certains intermédiaires réactionnels peuvent conduire à la formation de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 (Goeptar et coll, 1995 ; Schlichting et coll, 2000).

L'hémoglobine et la myoglobine sont des transporteurs d'oxygène qui le lient au niveau du Fe^{2+} de leur hème. Une délocalisation électronique sur l'oxygène peut conduire à la formation de $O_2^{\bullet-}$ et de met-hémoglobine (hème- Fe^{3+}) ne pouvant plus lier l'oxygène (Nagababu et Rifkind, 2000).

Enfin, le superoxyde peut être aussi produit à but défensif. Les phagocytes par exemple possèdent dans leur membrane le système NADPH oxydase, complexe flavohémoprotéique, dont le rôle est de produire $O_2^{\bullet-}$ en utilisant le NADPH comme réducteur de O_2 (Cross et coll, 1999). En présence de microorganismes pathogènes, la NADPH oxydase est activée parallèlement à la phagocytose. L' $O_2^{\bullet-}$ produit, en combinaison avec l'activité de la myéloperoxydase et de la NO synthase, joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux. Le système NADPH oxydase est le principal producteur de superoxyde chez les eucaryotes (Winterbourn, 2008 ; Suh et coll, 1999).

Réactivité de $O_2^{\bullet-}$

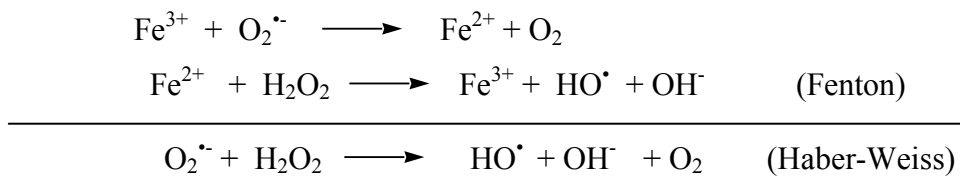
Bien que $O_2^{\bullet-}$ puisse être à la fois oxydant ($O_2^{\bullet-}/H_2O_2$: + 900 mV/ENH) et réducteur ($O_2/O_2^{\bullet-}$: - 160 mV/ENH) (Pierre et Fontecave, 1999), il est généralement considéré comme peu réactif chimiquement vis-à-vis des systèmes biologique (Bielski et Richter, 1977). A concentration physiologique, estimée à environ 10^{-10} M, l'anion superoxyde ne réagit pas en général avec les acides aminés des protéines à moins qu'elles n'aient un groupement thiol accessible. Dans ce cas, il peut alors oxyder le groupement thiol et modifier sa fonctionnalité (Imlay, 2003). Le superoxyde peut néanmoins oxyder certains sucres et créer des composés dicarbonylés réactifs avec les groupes amino des protéines et de l'ADN (Okado-Matsumoto et

Fridovich, 2000). Cependant, en solution aqueuse il est très instable et tend à se dismuter spontanément très rapidement selon la réaction suivante (Halliwell, 1990) :



En milieu acide, $\text{O}_2^{\bullet-}$ se protone pour donner le radical HO_2^{\bullet} ($\text{pK}_a = 4.8$). Le radical HO_2^{\bullet} est beaucoup plus réactif que $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Gebicki et Bielski, 1981). Cependant sa réactivité biologique est très limitée car HO_2^{\bullet} n'est présent qu'en très faible quantité à pH physiologique.

Toutefois, malgré cette faible réactivité chimique du superoxyde, Carlioz et Touati ont démontré en 1986 que l'inactivation des systèmes de détoxification du superoxyde chez *E. coli* induit une toxicité telle qu'elle inhibe la croissance cellulaire en milieu aérobie. Pendant longtemps la toxicité du superoxyde a été associée à sa capacité à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , favorisant ainsi la réaction de Fenton et la production de l'espèce très toxique, le radical d'hydroxyle HO^{\bullet} (Halliwell et Gutteridge, 1986). Le bilan de cette réaction est rapporté sous le nom de Haber-Weiss :



Cependant, même si *in vitro* l'anion superoxyde peut être réducteur de Fe^{3+} , *in vivo*, compte tenu des concentrations en fer et superoxyde, cette réaction est beaucoup trop lente pour effectivement pouvoir se dérouler (Imlay, 2003).

Ce n'est qu'assez récemment que la toxicité de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a été clairement reliée à sa capacité à induire une élévation de la quantité de fer libre dans la cellule (Keyer et Imlay, 1996). Cela a été mis en évidence chez des souches de *E. coli* délétées des gènes *sodA* et *sodB*, codant pour les superoxydes dismutases à Mn et à Fe. Ces souches sont auxotrophes pour les amino-acides branchés et sont incapables de cataboliser des sources de carbone non fermentables en conditions aérobies (Carlioz et Touati, 1986). Il a été démontré que ces phénotypes sont dus à l'inactivation par $\text{O}_2^{\bullet-}$ de certaines enzymes à centre [4Fe-4S] impliquées dans ces métabolismes, dont par exemple la dihydroxy-acid déshydratase, l'aconitase B et les fumarases A et B (Benov et Fridovich, 1999). Il a été montré que le superoxyde oxyde spécifiquement les centres [4Fe-4S] très exposés au solvant de ces enzymes hydrolytiques, entraînant la libération dans le milieu cellulaire de fer libre (Imlay, 2006). L'enzyme se retrouve alors sous une forme [3Fe-4S] inactive (Figure 3). Bien que ce processus conduise à l'inactivation des déshydratases, la toxicité est d'avantage liée à une

augmentation de la concentration de fer libre dans la cellule, directement responsable de la production de radicaux HO^\bullet par réaction de Fenton (Keyer et Imlay, 1996). Il s'ensuit alors des dommages cellulaires importants notamment au niveau de l'ADN (Nunoshiba et coll, 1999). Par ces processus, le superoxyde conduit donc à une augmentation du taux de mutations au sein de la cellule (Imlay, 2006) (Figure 4).

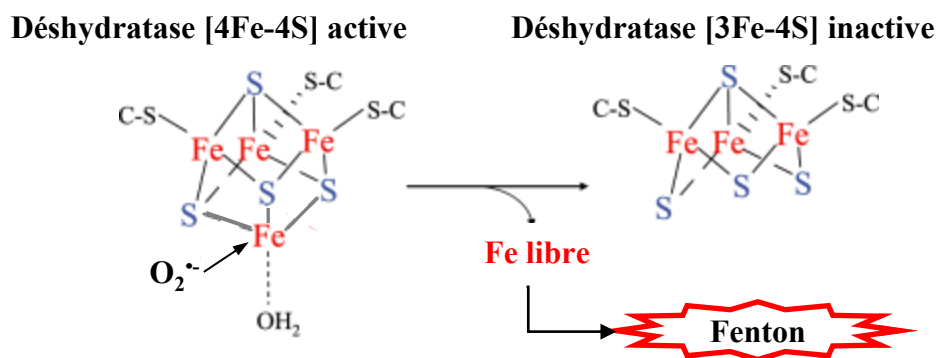
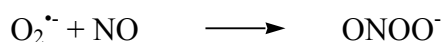


Figure 3 : Destruction du cluster $[4\text{Fe-4S}]$ de déshydratase par $\text{O}_2^{\bullet-}$.

La constante de vitesse d'oxydation des centres $[4\text{Fe-4S}]$ des déshydratases par $\text{O}_2^{\bullet-}$ est suffisamment élevée ($10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) pour que ces dommages soient importants dans les organismes aérobies (Flint et coll, 1993), ceci d'autant plus qu'il existe un mécanisme de remétallation de ces centres $[3\text{Fe-4S}]$ (Imlay, 2008). Une même déshydratase au contact de $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut donc conduire à une catalyse de libération de fer libre dans la cellule.

Enfin, chez les organismes supérieurs qui synthétisent du monoxyde d'azote (NO) par l'activité de NO synthase (NOS), le superoxyde peut réagir avec NO pour former l'anion peroxynitrite (ONOO^-) très délétère vis-à-vis des composés biologiques.



ONOO^- est une molécule oxygénée non radicalaire et chargée négativement. C'est un puissant oxydant ($\text{ONOO}^-/\text{NO}_2 : +1,4 \text{ V/ENH}$ à pH 7) et un agent de nitration notamment des résidus tyrosines (Beckman et Koppenol, 1996).

3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Production de H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène est formé par la réduction à deux électrons de l'oxygène (Figure 2). Il est formé essentiellement par dismutation du superoxyde, réaction qui peut être

catalysée par des ions métalliques ou par les superoxydes dismutases (SOD) (McCord et Fridovich, 1969 ; Fridovich, 1986).

H₂O₂ peut être aussi directement produit au niveau de la chaîne respiratoire, essentiellement par autooxydation de la NADH déhydrogénase II (Gondzalez-Flecha et Demple, 1995 ; Messner et Imlay, 1999). Cette enzyme, comme certaines autres oxydases flavoprotéiniques, peut transférer directement deux électrons de son cofacteur flavine à l'oxygène pour produire H₂O₂. Des études sur des souches de *E. coli* incapables de piéger le peroxyde d'hydrogène (*catalase*⁻, *peroxydase*⁻) ont permis de mesurer sa vitesse de formation (Seaver et Imlay, 2001). En phase exponentielle, la cellule qui consomme environ 3.2 mM/s d'O₂ produit environ 14 µM/s de H₂O₂. La concentration en H₂O₂ cellulaire est estimée à environ 10⁻⁸ M (Seaver et Imlay, 2001). Par ailleurs, H₂O₂ est également utilisé par certains organismes comme agent bactéricide. Les *Lactobacillaceae* utilisent le pyruvate et la lactate oxydase pour sécréter des concentrations importantes de H₂O₂ afin d'éliminer les microbes concurrents (Imlay, 2006).

Réactivité de H₂O₂

H₂O₂ est un oxydant puissant, le couple H₂O₂/HO[•] possède un potentiel d'oxydoréduction de + 460 mV/ENH. Le peroxyde d'hydrogène qui est une molécule neutre peut diffuser et conduire à la formation de radicaux libres loin de son lieu de formation. H₂O₂ peut se déprotoner pour donner l'anion hydroperoxyde (HO₂⁻) (pKa 11.8) et l'ion peroxyde (O₂²⁻) (pKa >14). Cependant ces espèces ne sont pas produites à pH physiologique. Enfin, bien que H₂O₂ soit un oxydant puissant, sa réactivité directe est assez faible. Toutefois, il n'en demeure pas moins que la toxicité cellulaire de H₂O₂ est forte. Par exemple, un mutant de la bactérie *E. coli* ne pouvant pas détoxifier H₂O₂, a une croissance totalement inhibée en présence de 1 µM de H₂O₂ dans le milieu de culture. La toxicité biologique de H₂O₂ tient surtout à sa capacité à produire le radical hydroxyle HO[•] par la réaction de Fenton, comme décrit précédemment (Seaver et Imlay, 2004).

Notons que le cuivre (I) libre peut également réagir avec H₂O₂ pour donner HO[•] par réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1984). Cependant la concentration cellulaire des ions cuivres est faible, environ 10 µM chez *E. coli* (la concentration d'ion fer est d'environ 0,1 mM chez *E. coli*) (Outten et O'Halloran, 2001) et cette réactivité Cu^I/H₂O₂ n'est pas déterminante *in vivo*.

Il a été rapporté que, tout comme O₂^{•-}, H₂O₂ pourrait augmenter la quantité de fer libre par oxydation des centres [4Fe-4S] des déshydratases. Cependant, cette réaction se fait avec

une constante de vitesse 100 à 1000 fois moins rapide que avec $O_2^{\bullet-}$ ($10^4 M^{-1}.s^{-1}$) et ne semble pas jouer un rôle important *in vivo* (Imlay, 2006).

Dans tous les cas, il est donc primordial que la concentration de H_2O_2 soit maintenue la plus faible possible afin d'éviter la formation de HO^{\bullet} dans la cellule, qui représente l'espèce la plus toxique qui peut être produite dans les milieux biologiques (voir § « Réactivité de HO^{\bullet} »).

4. Le radical hydroxyle HO^{\bullet}

Production de HO^{\bullet}

HO^{\bullet} est donc généré essentiellement à partir de H_2O_2 via la réaction de Fenton (Wink et coll, 1994). Cependant, les rayonnements UV (rupture homolytique de H_2O_2), les ultrasons (cassures des liaisons de l'eau) et les radiations ionisantes (radiolyse de l'eau) sont également capables de générer HO^{\bullet} (Von Sonntag, 2008).

Réactivité de HO^{\bullet}

Le couple HO^{\bullet}/OH^- possède un potentiel d'oxydoréduction de + 1.2 V/ENH et une demi-vie en milieu biologique, d'environ 10^{-9} s à 37 °C (Pryor, 1986). Le radical hydroxyle est très réactif. C'est le plus puissant oxydant qui puisse être généré au sein des cellules. Il réagit instantanément de façon non sélective, aux limites de la vitesse de diffusion, avec toutes les macromolécules biologiques, sucres, acides aminés, phospholipides, nucléotides ainsi qu'avec les acides organiques (Valentine et coll, 1998). Il **est donc extrêmement toxique pour la cellule** (Figure 5). En général, il réagit par arrachement d'un atome d'hydrogène d'une liaison C-H, conduisant à la formation concomitante d'un radical organique.

I Réactivité vis-à-vis de l'ADN

Les dommages oxydatifs causés par HO^{\bullet} sur l'ADN peuvent être de différentes natures. Les principaux dommages sont des pontages protéine-ADN (par exemple par liaison thymine-tyrosine), des coupures simples ou doubles brins, des dimérisations de deux thymines adjacentes au sein du même brin d'ADN, des formations de sites abasiques, ou encore des oxydations de bases (Henle et coll, 1996). Toutes ces oxydations peuvent être

létales pour les cellules. Des mécanismes de réparation existent et peuvent éviter, jusqu'à un certain point, l'accumulation de mutations au niveau du génome.

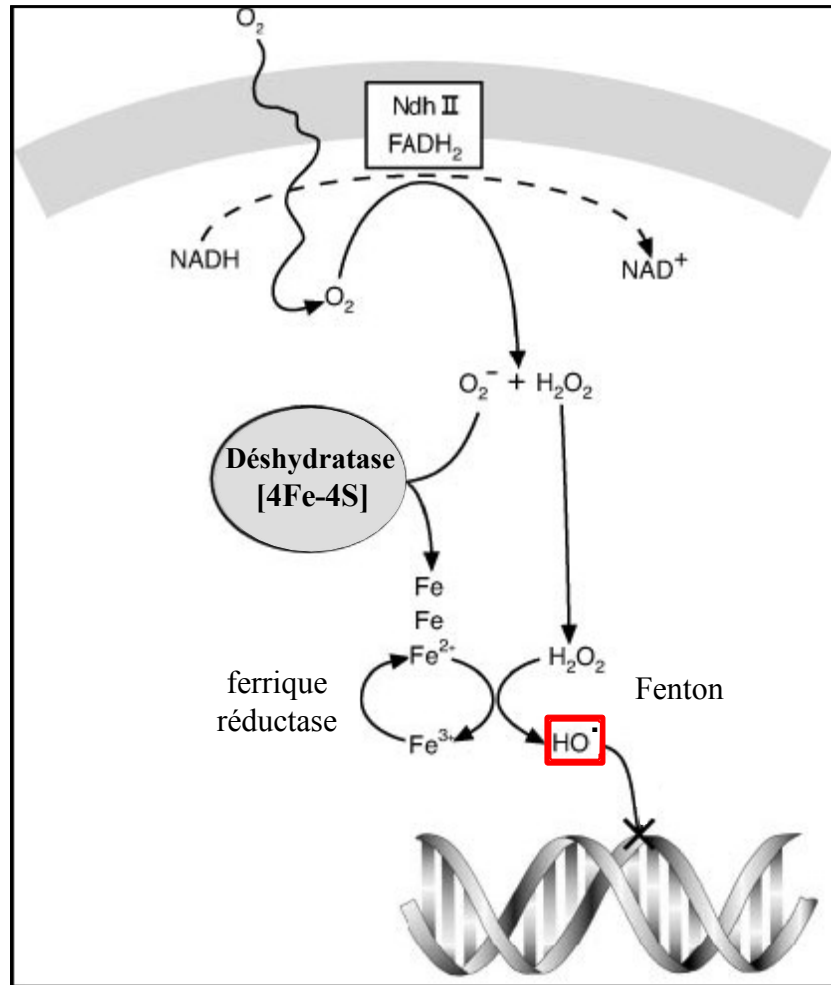


Figure 4 : Dommages de l'ADN causé par stress oxydatif : O₂⁻ oxyde les centres [4Fe-4S] des déshydratases, relâchant du fer libre dans le cytosol. Ce fer libre catalyse la réaction de Fenton, générant le radical hydroxyle qui attaque l'ADN.

L'ADN d'une cellule humaine subit environ 10 000 lésions oxydatives par jour. Cependant 99.9 % des lésions sont réparées avant que ne se produise une mutation définitive sur l'ADN. Le mode de réparation le plus courant est l'excision enzymatique d'un fragment nucléotidique ou d'une base endommagée et son remplacement. Cependant certaines lésions demandent l'intervention de systèmes plus spécifiques comme pour la réparation de dimères de thymines, de cytosines désaminées ou de déformations de la double hélice (Sancar, 1996).

2 Réactivité vis-à-vis des membranes cellulaires

Le radical hydroxyle est à l'origine de la peroxydation lipidique des acides gras membranaires. Ce processus oxydatif altère essentiellement les acides gras polyinsaturés, en particulier les acides arachidoniques, linoléiques et linoléniques (Schafer et coll, 2002).

La peroxydation lipidique provoque une désorganisation des membranes (cellulaire, HDL, LDL), entraînant une inactivation des systèmes enzymatiques membranaires, une diminution de la fluidité et une perte de la perméabilité sélective, pouvant conduire à la mort de la cellule (Hatta et Frei, 1995). Elle peut également générer des substances toxiques (des aldéhydes, des acides thiobarbituriques (TBAS), du malondialdéhyde, du 4-hydroxynonénal) issues de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques (Esterbauer et coll, 1991).

Chez les bactéries, seuls les acides gras polyinsaturés des membranes thylakoïdes des bactéries photosynthétiques sont de bonnes cibles de peroxydation (Imlay, 2003).

3 Réactivité vis-à-vis des protéines

Le radical hydroxyle est capable d'oxyder les acides aminés des protéines. L'oxydation des acides aminés est généralement induite par le radical hydroxyle mais peut aussi l'être par H_2O_2 . Ces modifications peuvent intervenir sur la chaîne carbonée principale (Berlett et Stadtman, 1997) ou des chaînes latérales (Uchida et coll, 1990), et peuvent entraîner la perte de la structure et/ou de la fonction d'une protéine.

5. L'oxygène singulet et l'ozone

On peut également mentionner deux autres espèces dérivées de l' O_2 , l'oxygène singulet et l'ozone, qui peuvent être associées à des E.A.O. Lorsqu'un des deux électrons non appariés de l'oxygène est excité, son état de spin change et les deux électrons ont alors des spins antiparallèles. Cela entraîne la formation d'une molécule très réactive, l'**oxygène singulet** (1O_2) (Briviba et coll, 1997). 1O_2 apparaît principalement au cours de réactions photochimiques (Schweitzer et Schmidt, 2003).

1O_2 peut diffuser à travers les membranes et peut accepter deux électrons simultanément pour former des peroxydes. Il a pour cibles biologiques les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Redmond et Kochevar, 2006).

L'**ozone** est un composé chimique comportant 3 atomes d'oxygène (O_3), et peut être produit sous l'action du rayonnement solaire par photodissociation d'une molécule d'oxygène. L'ozone est un agent oxydant puissant. Il est impliqué notamment dans certaines formes d'irritation des voies respiratoires (Last et coll, 1994).

La Figure 5 résume les processus de formation des E.A.O à partir de l' O_2 ainsi que les dommages cellulaires principaux qu'elles génèrent.

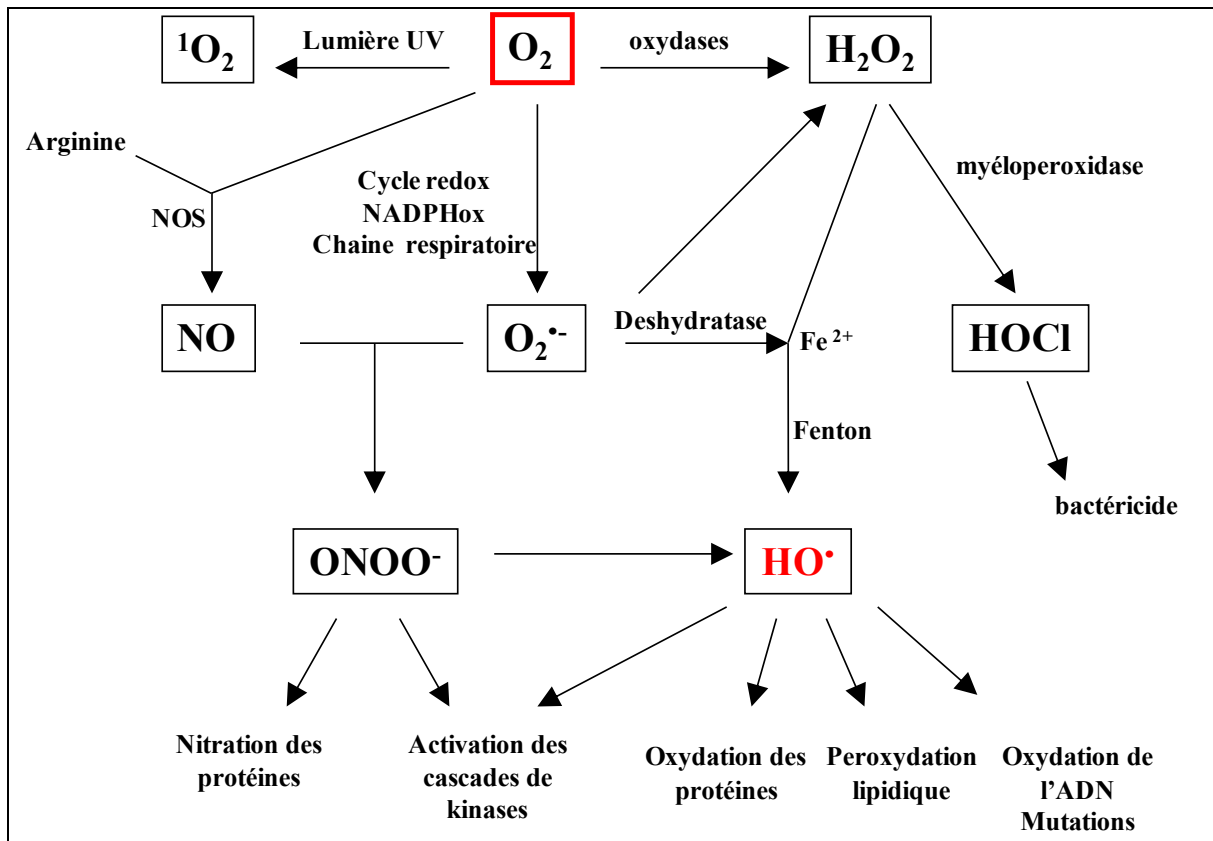


Figure 5 : Espèces réactives de l'oxygène et dommages cellulaires.

B. Les systèmes anti-oxydants

Les organismes utilisent des petites molécules ainsi que divers systèmes enzymatiques pour piéger les E.A.O. et lutter ainsi contre le stress oxydant. Les principaux systèmes anti-oxydants sont représentés dans la Figure 6.

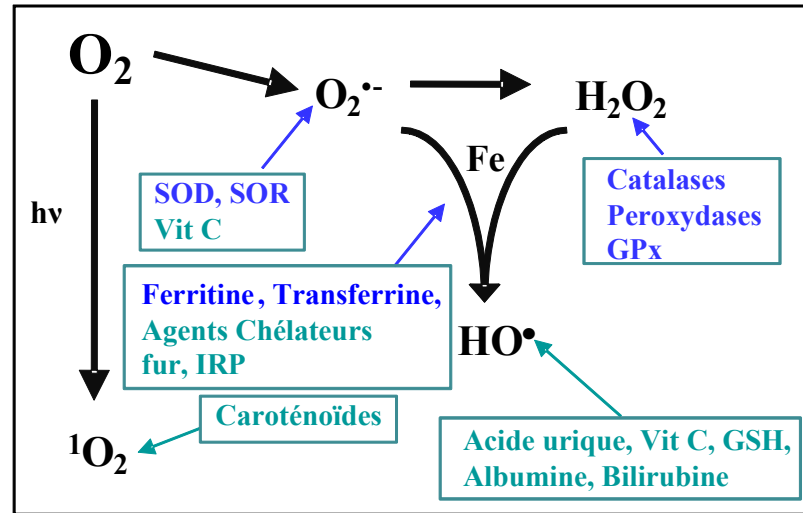
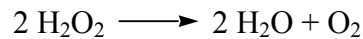


Figure 6 : Les différents systèmes de défenses antioxydants et leurs cibles (en bleu les systèmes enzymatiques).

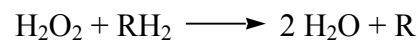
1. Les enzymes anti-oxydantes

a) Les catalases et les peroxydases sont des enzymes qui catalysent l'élimination des peroxydes.

Les **catalases** dismutent H_2O_2 présent en grande concentration (Valentine et coll, 1998) :



Les **peroxydases** réduisent H_2O_2 présent à faible concentration (Valentine et coll, 1998) :

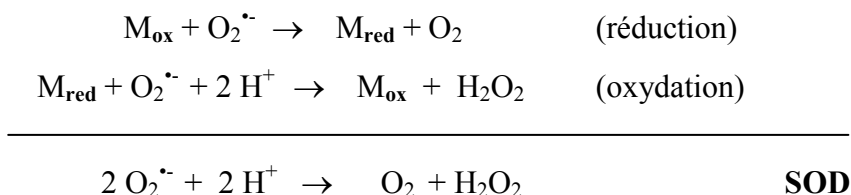


b) Les superoxyde dismutases (SOD) et les superoxyde réductases (SOR) sont des métallo-enzymes qui catalysent la détoxification du radical superoxyde (McCord et Fridovich, 1969 ; Jenney et coll, 1999 ; Lombard et coll, 2000).

On retrouve les **SODs** chez pratiquement tous les organismes vivants en présence d'oxygène. Les SODs dismutent $\text{O}_2^{\bullet-}$, en H_2O_2 et O_2 (McCord et Fridovich, 1969, Fridovich, 1986). Il existe quatre types de SOD qui diffèrent par leur cofacteur métallique (Cu/Zn, Mn, Fe ou Ni) ainsi que par leur localisation cellulaire. Les SOD à Mn sont présentes dans le cytosol des bactéries, dans les mitochondries des organismes supérieurs, les chloroplastes et également dans le cytosol de certaines cellules eucaryotes (Keele et coll, 1970). Les SOD à Fe sont présentes chez les bactéries, chez certains protozoaires comme *Trypanosoma cruzi* (Temperton et coll, 1996) et quelques plantes (Yost et Fridovich, 1973). Les SODs à Cu/Zn se

trouvent dans le cytoplasme, le noyau, les mitochondries, les lysosomes et les peroxysomes des cellules eucaryotes (Geller et Winge, 1982 ; Chang et coll, 1988) ainsi que dans le périplasme de certaines bactéries à gram négatif (Benov et coll, 1996). Les SOD à Ni ont été récemment découvertes dans le cytosol de bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* et chez des cyanobactéries (Youn et coll, 1996 ; Choudhury et coll, 1999 ; Palenik et coll, 2003).

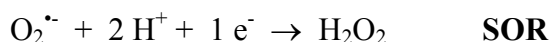
La dismutation du superoxyde catalysée par toutes les SODs peut être écrite par deux demi-réactions faisant intervenir $O_2^{\bullet-}$ à la fois comme réducteur et comme oxydant vis-à-vis du métal du site actif (M) (Klug et coll, 1972) :



avec M = Cu, Mn, Fe ou Ni.

Notons que, bien que la SOD soit à la fois une des enzymes les plus active et les plus abondante de *E. coli*, la bactérie synthétise juste assez de SOD pour se défendre contre le superoxyde endogène. Une augmentation d'un facteur deux de la concentration de $O_2^{\bullet-}$ dans la cellule, sans induction de SOD supplémentaire, entraîne une diminution de l'activité des déshydratases dans la cellule. Une augmentation d'un facteur cinq induit des dommages à l'ADN (Gort et Imlay, 1998).

Les **SORs** réduisent $O_2^{\bullet-}$ en produisant H_2O_2 sans formation d' O_2 (Jenney et coll, 1999 ; Lombard et coll, 2000). Elles ont été découvertes il y a seulement une dizaine d'années. Contrairement aux SODs qui sont ubiquitaires, les SORs ont été identifiées, jusqu'à présent, uniquement chez certains procaryotes dont les bactéries sulfato-réductrices (Nivière et Fontecave 2004). Elles constituent à ce jour la seule alternative connue aux SODs pour éliminer $O_2^{\bullet-}$. Ce sont de petites métalloprotéines à centre mononucléaire de fer. Leurs caractéristiques et propriétés sont décrites en détail au § « II La superoxyde réductase »



2. Les piégeurs de HO^{\bullet}

HO^{\bullet} est tellement réactif qu'il n'existe apparemment pas de système enzymatique pour catalyser directement son élimination. Toutefois, il existe de petites molécules capables de piéger HO^{\bullet} . Il s'agit par exemple de l' α -tocophérol (vitamine E), le β -carotène (provitamine

A), l'ubiquinone, la coenzyme Q10 (CoQ10), l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion ou l'acide urique (Evelson et coll, 2001). L'E.A.O. la plus toxique est le radical hydroxyle. Les organismes contrôlent surtout la production de HO^\bullet en amont, en limitant la concentration de ses précurseurs, $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 , qui le forment par la réaction de Fenton. Ils sont éliminés par des enzymes efficaces (SOR, SOD, catalase et peroxydase). La quantité de fer libre toxique, catalysant la réaction de Fenton, est également contrôlée en régulant l'apport et le stockage du fer (Imlay, 2008).

3. Régulation génétique des systèmes antioxydants

Lors d'un stress oxydant, la synthèse de protéines de détoxification et de réparation est induite alors que l'expression de certaines protéines potentiellement oxydantes est réprimée (Rodionov et coll, 2004 ; Mukhopadhyay et coll, 2007). Cette régulation génétique est possible par la présence de facteurs de transcriptions sensibles à la concentration des E.A.O.

Régulation génétique en présence de peroxyde

Chez les Procaryotes, PerR (présent chez *Bacillus subtilis*) et OxyR (présent chez *E. coli*) sont des senseurs de peroxyde. Bien que ces deux protéines opèrent par des mécanismes très différents, elles ont la même fonction chez les organismes les possédant. Elles régulent toutes deux l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le piégeage des peroxydes et le métabolisme du fer (Mongkolsuk et Helmann, 2002). Ces gènes incluent la catalase, la peroxyredoxine AphC ainsi que Fur, le régulateur transcriptionnel qui contrôle l'incorporation du fer chez les bactéries (Bagg et Neidlands, 1987). OxyR joue aussi un rôle dans le contrôle redox des thiols en régulant l'expression des glutathions réductases, glutarédoxines (Grx) et thiorédoxines (Trx) (Fuangthong et coll, 2001).

OxyR est activée par H_2O_2 lorsque sa concentration est supérieure à 20 nM, ce qui correspond à des conditions physiologiques normales (Aslund et coll, 1999). H_2O_2 oxyde une des cystéines de OxyR en acide sulfonique. Une seconde cystéine réduit cet acide sulfonique et conduit à la formation d'un pont disulfure. Le changement de conformation induit par cette oxydation permet à la protéine de se fixer à l'ADN (Figure 7) (Zheng et coll, 1998). OxyR est désactivée par la glutarédoxine (Grx), ce qui conduit à une autorégulation de OxyR (D'autréaux et Toledano, 2008).

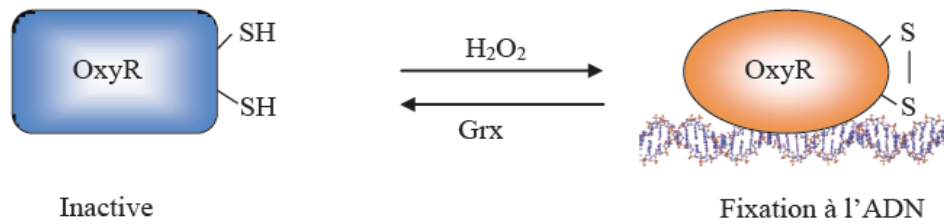


Figure 7 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription OxyR par H_2O_2 .

De façon intéressante, tandis que la protéine OxyR utilise des résidus cystéines pour détecter le peroxyde, le mécanisme d'activation de PerR fait intervenir un site régulateur contenant un atome de fer (Lee et Helmann, 2006). En présence de H_2O_2 , le Fe^{2+} du site de régulation de PerR catalyse une réaction du type Fenton conduisant à la formation d'un radical hydroxyle. HO^\bullet oxyde alors les deux histidines ligand du fer de PerR en 2-oxo-histidine. Cette oxydation entraîne le relargage du fer et la perte de la liaison de PerR à l'ADN, permettant ainsi l'expression des gènes régulés par PerR (Figure 8). A la différence de OxyR, PerR est un régulateur sacrificiel, ce qui lui permet d'être directement sensible aux conditions de formation de la réaction de Fenton dans la cellule (Lee et Helmann, 2006).

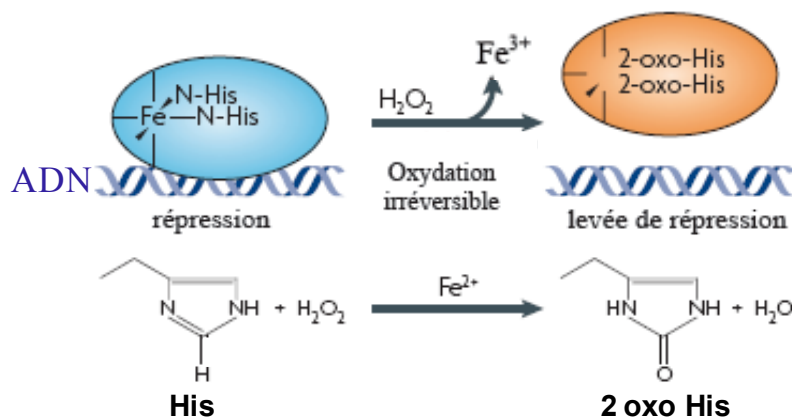


Figure 8 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription PerR par H_2O_2 .

Chez la levure comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, Yap-1 est le régulateur transcriptionnel qui permet d'induire une réponse au stress H_2O_2 (Delaunay et coll, 2000). Yap-1 est activé par H_2O_2 et constitue avec Orp1, une enzyme GPX like, l'équivalent de OxyR chez la levure.

Régulation génétique en présence de superoxyde

Chez *E. coli*, le régulon SoxR/S répond spécifiquement au stress superoxyde (Tsaneva et Weiss, 1990). Un tel système de régulation transcriptionnel sensible spécifiquement à $\text{O}_2^{\bullet-}$ n'est, pour l'instant, connu que chez *E. coli*. SoxR/S régule les gènes impliqués dans la détoxification du superoxyde (par exemple les gènes codant pour les SODs) et la protection

et/ou réparation des centres [Fe-S], comme par exemple les gènes codant pour la ferrédoxine-NADPH-oxydoréductase (D'autréaux et Toledano, 2008). SoxR/S est un système de régulation à deux composants. SoxR est un senseur à centre [2Fe-2S] qui détecte le superoxyde. SoxS est un activateur transcriptionnel. Sous sa forme réduite, SoxR est lié au promoteur *soxS* et empêche sa transcription. L'oxydation du centre [2Fe-2S] de SoxR par $O_2^{\cdot-}$ entraîne un changement de conformation de SoxR qui induit une distorsion du promoteur *soxS*. Cela permet à l'ARN polymérase d'initier la transcription de SoxS (Nunoshiba et coll, 1992 ; Wu et Weiss, 1992). SoxS va alors se fixer spécifiquement sur les promoteurs de plusieurs gènes cibles et activer leur transcription (Li et Demple, 1994) (voir Figure 9). SoxR est réduit par la ferrédoxine NADPH-dépendant (Rsx), ce qui permet une réversibilité de son effet.

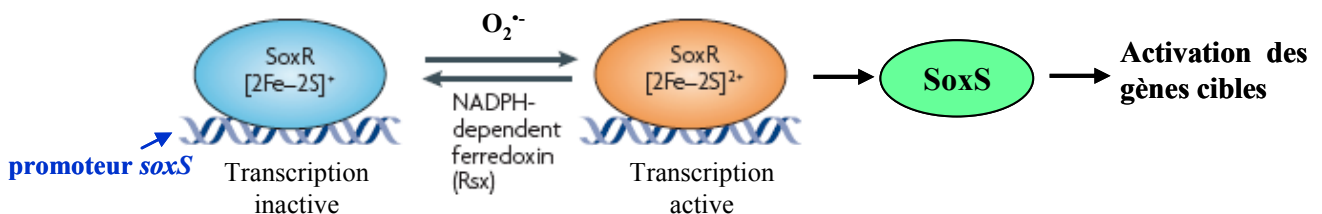


Figure 9 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription SoxR par $O_2^{\cdot-}$.

4. Le stress oxydant : un problème de santé majeur

Le dysfonctionnement des systèmes de piégeage des E.A.O. est à l'origine de l'apparition de processus de stress oxydant dans les cellules dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée. C'est ainsi que dans le développement de l'athérosclérose, le rôle des E.A.O. apparaît comme majeur (Steinberg et coll, 1989). Les E.A.O. sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome (épaississement des artères par un dépôt composé, en partie, d'esters de cholestérol). Les E.A.O. seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer, où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres (Klein et Ackerman, 2003). La maladie de Parkinson s'accompagne elle aussi d'un stress oxydant en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéasome (Jenner, 2003). Enfin, les E.A.O. semblent également jouer un rôle déterminant dans la cancérogenèse, en induisant l'apparition de mutations dans

l'ADN, ce qui constitue un facteur majeur dans l'initiation et le développement du cancer (Halliwell, 2007 ; Valko et coll, 2006).

Le développement des molécules de synthèse à propriétés antioxydantes constitue l'une des voies de recherche importante pour traiter ces différentes affections pour lesquelles le stress oxydant semble jouer un rôle majeur (Pong, 2003 ; Vertuani et coll, 2004). La compréhension du mécanisme de fonctionnement des systèmes de défense naturels contre les E.A.O. peut représenter un aspect très important dans l'élaboration de solutions pour les problèmes médicaux liés au stress oxydant chez l'homme.

II. La superoxyde réductase

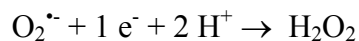
A. Généralités sur la SOR

1. La découverte de la SOR

Les systèmes de détoxification des E.A.O. sont aussi présents dans des organismes anaérobies, ils leur permettent de survivre lorsqu'ils sont transitoirement exposés à l'oxygène. Cependant, en général, malgré la présence de ces systèmes de détoxification, ces organismes anaérobies ne survivent pas à de longues expositions à l'oxygène. Les organismes anaérobies sont en fait beaucoup plus sensibles à l'oxygène que les organismes aérobies, sans doute à cause de la nature et de l'abondance de leurs systèmes de transfert d'électrons (Imlay, 2006). En effet, les métabolismes anaérobies font intervenir des réactions de transfert d'électrons avec des couples redox très réducteurs, qui impliquent, en général, un nombre important de métalloprotéines solubles (à centre [Fe-S]), très sensibles à O₂ (Imlay, 2006). De plus, leurs centres redox réduisent facilement O₂ pour former des E.A.O. en grande quantité. Ainsi les systèmes enzymatiques des organismes anaérobies sont à la fois des sources et des cibles des E.A.O. (Hillmann et coll, 2008). Sans système de détoxification, la présence d'oxygène dans le milieu, même à faible concentration, serait létale pour ces bactéries. Cela est d'autant plus nécessaire que l'import de molécules d'oxygène dans les milieux anaérobies est constant. La profondeur de la pénétration de l'oxygène dans les fonds marins par exemple, est fortement influencée par les mouvements d'eau ou par la bioturbation (Brune et coll, 2000). La sélection naturelle a donc poussé les bactéries vivantes dans ces milieux à acquérir des moyens de défense contre les E.A.O. (Cypionka, 2000). Ces systèmes sont à la fois classiques (SOD et catalase) mais aussi spécifiques, non présents chez les organismes aérobies.

C'est le cas notamment de la SOR, présente essentiellement chez des organismes anaérobies. Bien que les activités enzymatiques de la SOR et de la SOD soient différentes, elles sont aussi efficaces en terme de détoxification du superoxyde. La SOR peut totalement remplacer la suppression des SODs chez *E. coli* vis-à-vis d'un stress oxydant (Pianzzola et coll, 1996). On peut aussi mentionner la rubrerythrine (Rbr) qui est une peroxydase à centre dinucléaire à fer, et qui n'a pas d'équivalent chez les organismes aérobies (Kurtz, 2006).

Le point de départ de la découverte de l'activité des SORs remonte à 1996, quand Danièle Touati et son équipe ont rapporté qu'une petite métalloprotéine dont la fonction était inconnue à l'époque, la désulfoferrodoxine (Moura et coll, 1990), pouvait supprimer tous les effets délétères causés par l'inactivation de SOD chez *E. coli* (Pianzzola et coll, 1996). Par la suite Liochev et Fridovich ont proposé que la désulfoferrodoxine soit impliquée directement ou indirectement dans la capture de l'anion superoxyde (Liochev et Fridovich, 1997), mais sans posséder d'activité superoxyde dismutase (SOD). La caractérisation d'une activité superoxyde réductase pour la désulfoferrodoxine a été rapportée peu après, simultanément par deux groupes différents (Jenney et coll, 1999 ; Lombard et coll, 2000). Il a été montré que la SOR catalyse la réduction de l'anion superoxyde pour donner du peroxyde d'hydrogène sans production d'oxygène, selon la réaction suivante :



La SOR est impliquée dans la détoxification de l'anion superoxyde chez les bactéries anaérobies, microaérotolérantes ou microaérophiliques (Nivière et Fontecave, 2004). Elle n'est pas présente chez les eucaryotes. Une grande partie des organismes qui possèdent une SOR possèdent également une SOD ainsi que des systèmes de détoxification de H_2O_2 comme les catalases et peroxydases (Nölling et coll, 2001 ; Heidelberg et coll, 2004). C'est le cas notamment des bactéries sulfato-réductrices. Cependant chez ces microorganismes, des études ont montré que l'inactivation du gène codant pour la SOR induit une sensibilité des cellules à l'oxygène bien supérieur à celle induite par l'inactivation des gènes codant pour la SOR (Fournier et coll, 2006). Cela est dû en partie au fait que la SOR est présente dans le cytoplasme, endroit où se trouve notamment l'ADN, alors que chez ces microorganismes la SOD est périplasmique. Chez ces bactéries, la SOR joue donc un rôle essentiel dans la lutte contre le stress oxydant (Dolla et coll, 2006).

D'un point de vue plus appliqué, notons que la SOR peut représenter une nouvelle cible d'agent antibactérien, certains organismes ne possèdent pas de SOD, mais uniquement la SOR comme moyen de défense contre le stress superoxyde (Fraser et coll, 1998 ; Lombard et coll,

2000). C'est le cas de *Treponema pallidum*, l'agent infectieux responsable de la syphilis (Singh et Romanowski, 1999). La SOR n'est pas présente chez les eucaryotes mais essentielle à la survie des microorganismes qui la contiennent, la découverte d'inhibiteurs de la SOR pourrait donc conduire à la mise au point de nouveaux types d'antibiotiques.

2. Le site actif

La SOR est une petite métalloprotéine à fer capable de réagir avec l'anion superoxyde de manière très rapide, à la limite de la vitesse de diffusion des molécules en solution ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Lombard et coll, 2000). Différentes structures cristallographiques de SORs issues de différents microorganismes *Desulfovibrio desulfuricans* (Coelho et coll, 1997), *Pyrococcus furiosus* (Yeh et coll, 2000), *Desulfoarculus baarsii* (Adam et coll, 2004) et *Treponema pallidum* (Santos-Silva et coll, 2006) ont été résolues à ce jour et ont montré des structures de site actif très similaires.

Le site actif de la SOR possède une structure assez atypique avec une géométrie pyramidale à base carrée, constituée d'un centre mononucléaire de fer ferreux pentacoordiné de type $[\text{Fe}^{2+}(\text{HisN})_4(\text{CysS})_1]$ (Figure 10), avec une sixième position de coordination libre.

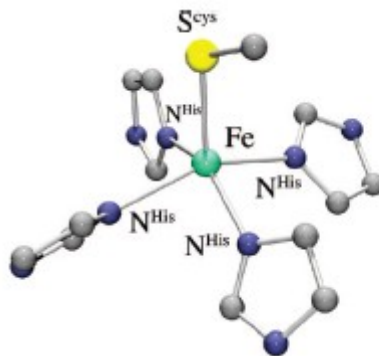
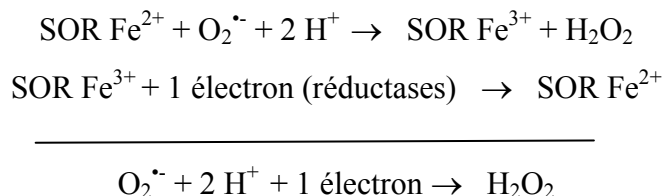


Figure 10 : Site actif de la SOR.

Le fer ferreux de la SOR est stable à l'oxygène. Notons que la présence d'une cystéine en position axiale rend ce site tout à fait particulier.

Seule la forme réduite de la SOR est capable de réagir avec l'anion superoxyde. $\text{O}_2^{\cdot-}$ vient se fixer sur la sixième position de coordination libre du fer pour être réduit en peroxyde d'hydrogène (Figure 10). La SOR s'oxyde donc en réduisant le superoxyde à un électron. La présence de donneurs d'électrons, réductases partenaires physiologiques de la SOR, est nécessaire pour régénérer le site ferrique et finaliser le cycle catalytique de l'enzyme (voir Figure 11).



Le site actif de la SOR possède un potentiel relativement élevé (+370 mV/ENH à pH 7 pour la SOR de *D. baarsii*) (Nivière et coll, 2004) et est très exposé au solvant. De ce fait, il accepte les électrons d'une large gamme de réducteurs cellulaires (Auchère et coll, 2006). Il a été montré que la rubrédoxine est un donneur d'électrons efficace pour la SOR de *D. vulgaris* Hildenborough (Coulter et Kurtz, 2001), *Archaeoglobus fulgidus* (Rodrigues et coll, 2005), *Pyrococcus furiosus* (Grunden et coll, 2005) et *Treponema pallidum* (Auchère et coll, 2004).

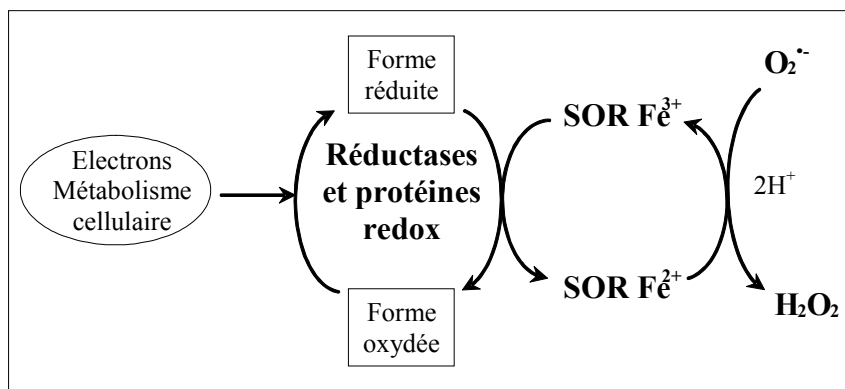


Figure 11 : Cycle catalytique de la SOR.

Au cours de l'oxydation du site actif, il a été montré que la lysine 48 et le Glutamate 47, deux résidus très conservés et proches du centre à fer, changent de conformation (Yeh et coll, 2000 ; Berthomieu et coll, 2002) (Figure 12). La lysine s'éloigne du fer (le groupement NH_3^+ de la lysine passe de 6.6 Å à 12.6 Å du fer) tandis que le carboxylate du glutamate, distant du fer de 10.6 Å à l'état réduit, devient le 6^{ème} ligand du Fe^{3+} . Ce basculement du glutamate se produit également en absence de lysine sur le mutant K48I de la SOR de *D. baarsii* (Berthomieu et coll, 2002).

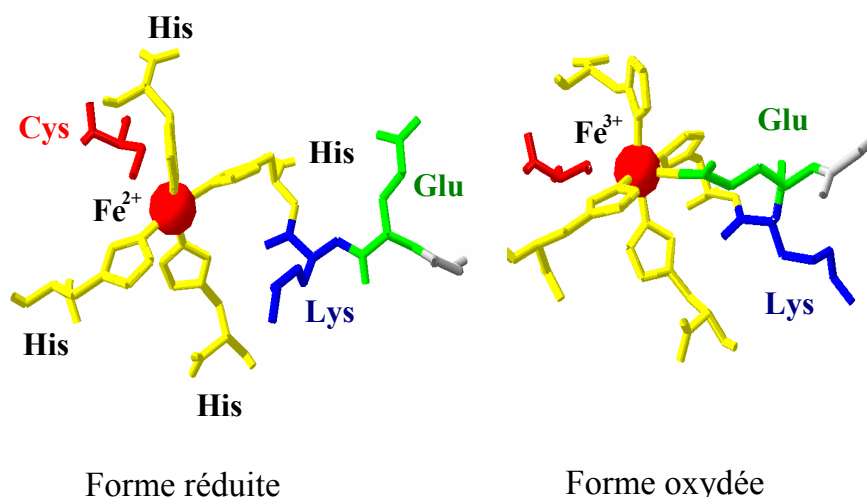


Figure 12 : Structure du site actif de la SOR (Yeh et coll, 2000). Sous la forme réduite Fe^{2+} , le résidu lysine est le résidu le plus proche de la 6^{ème} liaison de coordination du fer. Sous la forme oxydée Fe^{3+} , le résidu glutamate devient le 6^{ème} ligand du fer. La numérotation au Glu47 et Lys48 correspond à celle de la séquence de la SOR de *D. baarsii*.

A l'état réduit, le spectre d'absorption de la SOR ne présente pas de bande d'absorption UV-visible. A l'état oxydé, le spectre d'absorption du site actif est dominé par une bande de transfert de charge [$\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$] (Clay et coll, 2002), avec un maximum d'absorption entre 560-650 nm en fonction du pH (Nivière et coll, 2004) (Figure 13). A pH acide, le maximum d'absorption est centré à 650 nm ($\text{pH} < 7,5$), alors qu'à pH basique ($\text{pH} > 10$) le maximum d'absorption est centré à 560 nm.

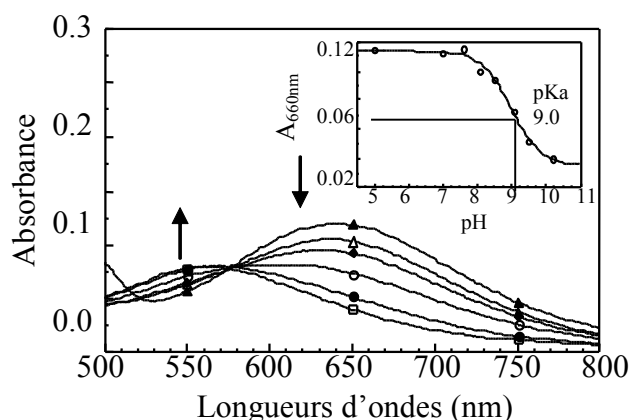


Figure 13 : Dépendance du spectre d'absorbance du site actif de la SOR sauvage de *D. baarsii* vis-à-vis du pH. Spectre à pH 5 (\blacktriangle), à pH 8.1 (\triangle), à pH 8.5 (\blacklozenge), à pH 9.1 (\circ), à pH 9.5 (\bullet) et à pH 10.2 (\square). La figure en médaillon montre la courbe de variation de la DO à 660 nm en fonction du pH avec une valeur de pKa apparent de 9.0 (d'après Nivière et coll, 2004).

Il a été montré que cette modification des spectres en fonction du pH, appelé transition alcaline, est liée au fait que le groupement carboxylate du Glutamate 47 et l'anion HO^- sont en compétition pour occuper la sixième liaison de coordination du Fe^{3+} (Mathé et coll, 2005).

Pour la SOR de *D. baarsii*, ce processus d'échange de ligand Glu/ HO^- a l'apparence d'un équilibre acido-basique avec une valeur de pKa de 9.0 (Nivière et coll, 2004). En l'absence du glutamate (mutant E47A), le spectre du fer ferrique présente toujours une transition alcaline mais avec une valeur de pKa de 6.7. Pour le mutant E47A, une molécule d'eau remplace le ligand Glu à pH acide et la transition alcaline, se fait alors entre les espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$ et $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ (Mathé et coll, 2005). La valeur du pKa plus faible dans le mutant E47A suggère que la fixation du ligand HO^- est facilitée en absence du ligand Glu.

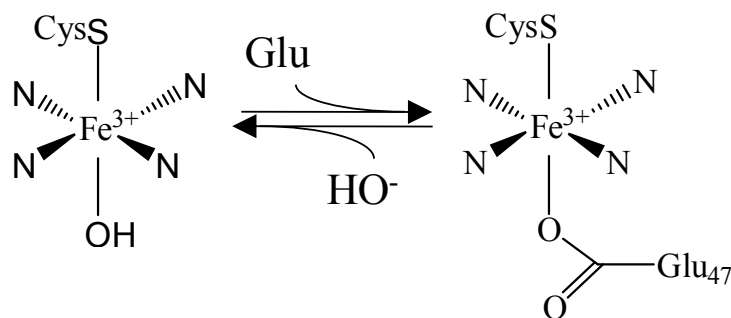


Figure 14 : Transition alcaline du site actif oxydé de la SOR.

Il faut noter que la mutation du résidu glutamate 47 en alanine n'affecte pas la réactivité de la SOR vis-à-vis du superoxyde (Lombard et coll, 2001). De plus l'expression du mutant E47A dans une souche *sod^t* de *E. coli* restaure sa capacité de croissance aérobie aussi efficacement que la SOR sauvage (Lombard et coll, 2001). Le glutamate 47 n'apparaît donc pas indispensable à l'activité superoxyde réductase de la SOR. Il est possible que, *in vivo*, le Glutamate 47 puisse éviter que de petites molécules se fixent sur la 6^{ème} liaison de coordination du Fe^{3+} , pouvant inhiber le site actif de la protéine. Cependant, actuellement, ce rôle du Glu 47 reste à l'état d'hypothèse. Récemment il a été découvert chez la bactérie *Nanoarchaeum equitans* une SOR qui possède un résidu proline à la place du glutamate 47 (Todorovic et coll, 2009). Cette SOR, comme le mutant de *D. baarsii* E47A est totalement fonctionnelle. Cette découverte pose de nouveau la question de la fonction de ce résidu glutamate dans les SORs qui le possèdent.

Il a été montré que la mutation de la lysine 48 en isoleucine a aussi un effet sur le pKa de la transition alcaline (Nivière et coll, 2004). La valeur du pKa passe de 9.0 pour la SOR sauvage à 7.6 pour le mutant. Par spectroscopie de résonance Raman, il a été montré que la Lysine 48 interagit par liaison hydrogène avec le ligand HO^- de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ (Mathé et coll, 2005). La présence de cette liaison hydrogène affaiblit la liaison Fe-OH , ce qui se traduit par un pKa plus faible pour la transition alcaline de la SOR K48I par rapport à l'enzyme sauvage.

B. Les différentes classes de SOR

Comme cela a été dit auparavant, toutes les SORs caractérisées à ce jour possèdent un site actif très similaire. Cependant, l'alignement des séquences connues de SORs permet la distinction de trois différentes classes de SOR, essentiellement basées sur la présence ou non d'un domaine N-terminal pouvant renfermer ou non un second site à fer de type désulforédoxine Fe^{3+}S_4 (Pereira et coll, 2007), en plus du site à fer catalytique. Ce second site à fer, appelé aussi Centre I, est caractérisé par la présence d'une séquence consensus de type CXXC---CC. Le domaine C-terminal qui renferme le site actif, appelé aussi Centre II, est présent dans toutes les différentes classes de SORs avec une forte homologie de séquence et est caractérisé par le motif H---HXXXXXH---CXXH, définissant les ligands du fer ferreux (Pereira et coll, 2007). Les séquences des trois différentes classes de SOR peuvent être schématisées de la façon suivante (Figure 15).

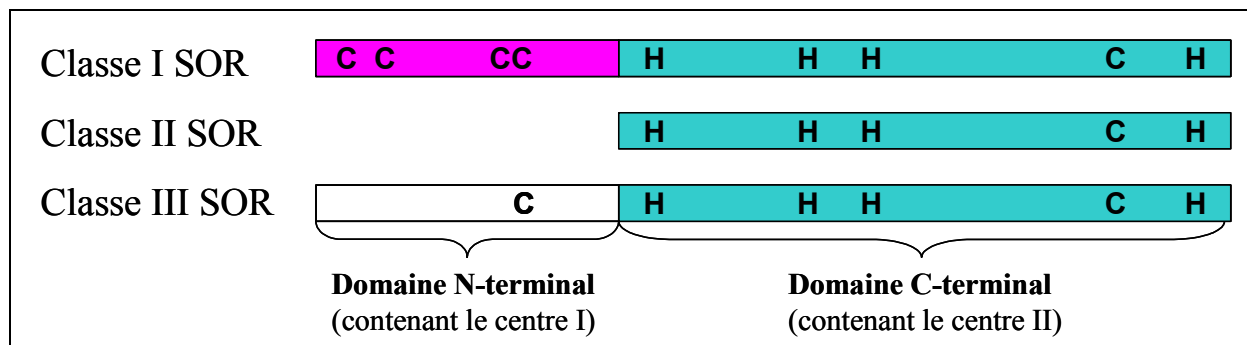


Figure 15 : Alignement schématique des 3 classes de SOR avec les ligands des Centre I et II.

Un alignement de séquences de quelques séquences de SOR est représenté ci-dessous :

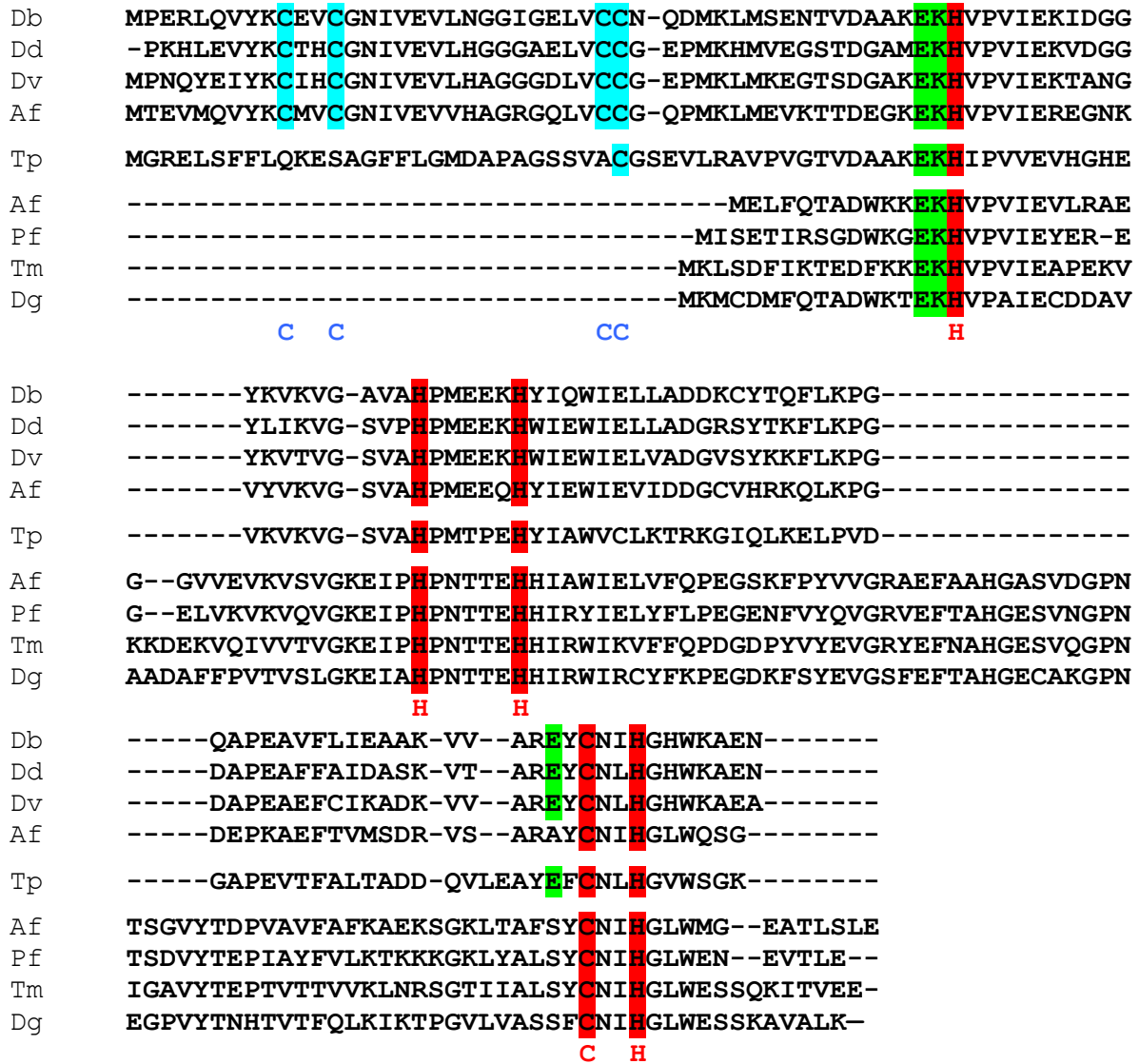


Figure 16 : SORs de *Desulfoarculus baarsii* (Db), *Desulfovibrio desulfuricans* (Dd), *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Dv), *Archaeoglobus fulgidus* (Af), *Treponema pallidum* (Tp), *Pyrococcus furiosus* (Pf), *Thermotoga maritima* (Tm), *Desulfovibrio gigas* (Dg). Les ligands du site desulforédoxine sont surlignés en bleu, les ligands du site actif sont surlignés en rouge et les acides aminés d'intérêts sont surlignés en vert.

Notons que les gènes de structure des SORs ne présentent pas de séquence signal. Cela montre que toutes les SORs sont localisées dans le cytoplasme des bactéries (Dolla et coll, 2006).

1. Les SORs de classe 1

Les SORs de classe 1 ont été appelées initialement désulfoferrodoxine (Dfx) (Moura et coll, 1990). Ces protéines ont été caractérisées par de nombreuses études biochimiques et spectroscopiques. Elles sont représentées par les enzymes de *Desulfovibrio desulfuricans* (Moura et coll, 1990 ; Coelho et coll, 1997), *Desulfoarculus baarsii* (Lombard et coll, 2000),

Archaeoglobus fulgidus (Rodrigues et coll, 2007) et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Moura et coll, 1990 ; Coulter et coll, 2000).

Ce sont de petites métalloprotéines homodimériques (2x14 kDa) contenant deux centres mononucléaires à fer non-hémique par monomère. Le site actif $[\text{Fe}^{2+}\text{N}_4\text{S}_1]$, appelé Centre II, se trouve dans le domaine C-terminal. Le second centre à fer, appelé Centre I, se situe dans le domaine N-terminal (Figure 15). C'est un centre de type désulforédoxine (rubrédoxine distordu), avec un fer sous forme oxydée Fe^{3+} en présence d'oxygène. Ce fer est coordonné par quatre atomes de soufre de cystéine $[\text{FeS}_4]$ (Coelho et coll, 1997 ; Adam et coll, 2004) (Figure 17).

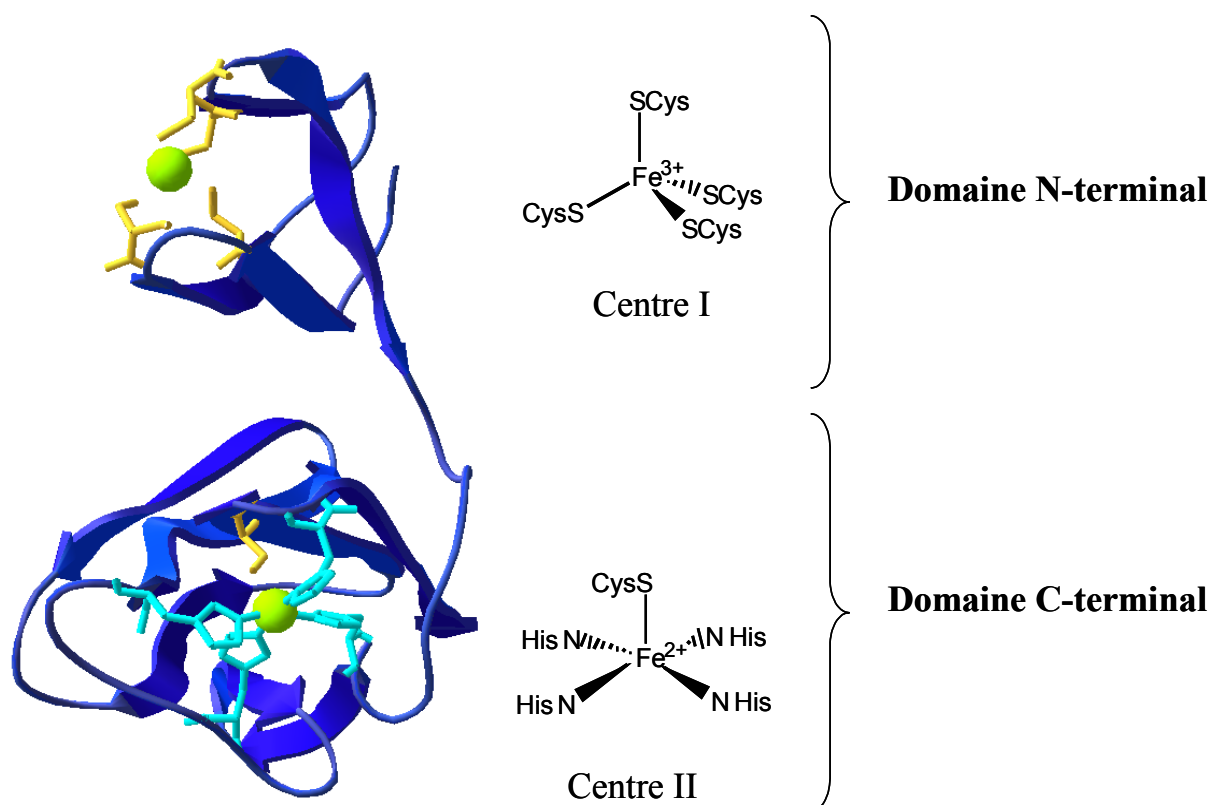


Figure 17 : Structure d'un monomère de la SOR de *D. baarsii*, représentante de la classe 1.

Les centres de type désulforédoxine sont connus pour leurs fonctions de relais électronique dans les réactions de transferts d'électrons (Auchère et coll, 2006). Cependant, il a été montré que ce Centre I n'est pas nécessaire à l'activité SOR. En effet, la mutation d'une cystéine du Centre I en sérine de la SOR de *D. vulgaris* empêche la formation du Centre I mais n'a aucun effet sur l'activité superoxyde réductase de l'enzyme (Emerson et coll, 2003). La fonction possible de ce Centre I sera discutée dans la partie « Résultats ».

2. Les SORs de classe 2

Les SORs de classe 2 étaient anciennement appelées neelarédoxine (Nlr) du fait de leur couleur bleu ('neela' signifie bleu en sanskrit) (Chen et coll, 1994). Ces protéines ont été caractérisées par de nombreuses études biochimiques et spectroscopiques et sont principalement représentées par les SORs de *Archaeoglobus fulgidus* (Abreu et coll, 2000), *Pyrococcus furiosus* (Jenney et coll, 1999) et *Desulfovibrio gigas* (Moura et coll, 1980).

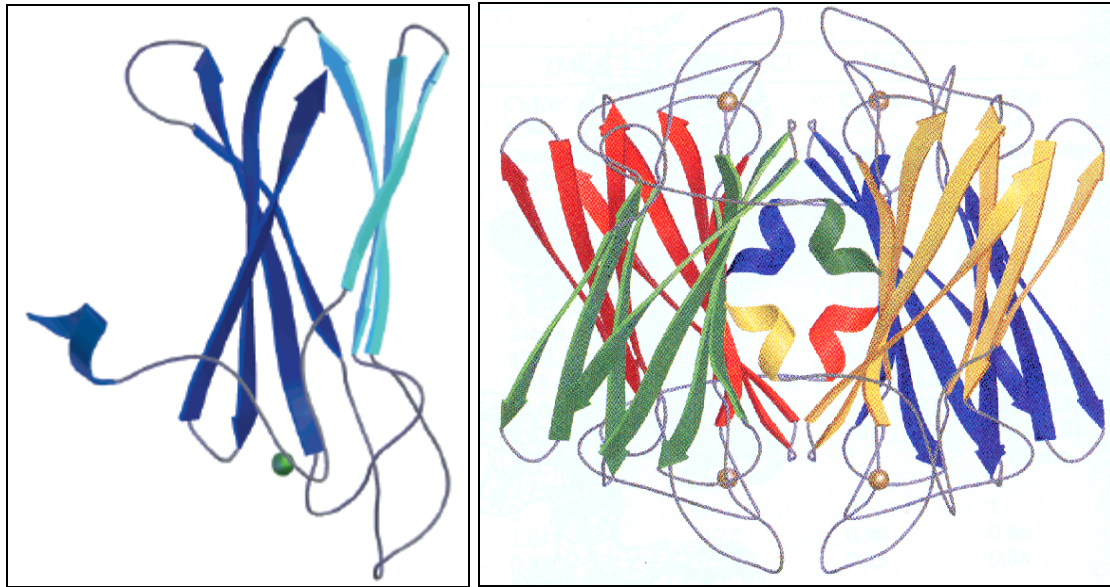


Figure 18 : Structure du monomère (A) et de l'homotétramère (B) de la SOR de *P. furiosus*, une SOR de classe 2 (Yeh et coll, 2000).

Les SORs de classe 2 présentent de fortes homologues de séquences et de structure avec le domaine C-terminal des SORs de classes 1 et 3 (voir Figure 18) (Yeh et coll, 2000 ; Clay et coll, 2002). Elles ne possèdent pas de domaine N-terminal et s'organisent en homotétramère dans lequel chaque monomère de ~14,2 kDa contient uniquement le site actif [FeHis₄Cys₁].

Les structures cristallographiques du site actif des SORs de classes 1 et 2 sont superposables (Coelho et coll, 1997 ; Adams et coll, 2004 ; Yeh et coll, 2000). Cependant les données spectroscopiques de résonance Raman et de RPE montrent que les sites actifs des deux classes de SOR présentent quelques différences significatives. Le site actif de la SOR de *D. baarsii* présente un signal RPE rhombique alors celui de *P. furiosus* présente un signal plus axial (Clay et coll, 2002 ; Mathé et coll, 2006). D'autre part, la comparaison des données de résonance Raman des sites actifs oxydés montre des liaisons Fe-S et S_{cys}-C légèrement plus fortes chez *P. furiosus* que chez *D. baarsii* (Clay et coll, 2002 ; Mathé et coll, 2006). Il est

possible que le signal RPE axial du site actif oxydé de la SOR de *P. furiosus* soit lié à une liaison Fe^{3+} -S(cys) plus forte (Mathé et coll, 2006).

3. Les SORs de classe 3

La dernière classe de SOR est principalement représentée par les SORs de *Treponema pallidum* (Lombard et coll, 2000 ; Jovanovic et coll, 2000) et de *Clostridium acetobutylicum* (Ascenso et coll, 2000). L'analyse des séquences des gènes de structure de ces SORs montre, comme pour celles de classe 1, la présence de deux domaines distincts. Cependant le domaine N-terminal présente peu d'homologie de séquence (30 %) avec celui des SORs de classe 1. En particulier, trois des quatre cystéines formant le Centre I contenu dans le domaine N-terminal chez les SORs de classe 1 sont absentes chez les SORs de classes 3. La formation d'un centre à fer de type désulforédoxine est donc impossible.

Des études spectroscopiques (RPE, absorption UV-visible, FTIR) ont permis une bonne caractérisation de la SOR de *T. pallidum* (Jovanovic et coll, 2000 ; Lombard et coll, 2000 ; Nivière et coll, 2001 ; Berthomieu et coll, 2002). La première structure cristallographique de la SOR de *T. pallidum* a été obtenue en 2006 par l'équipe de Moura (Santos-Silva et coll, 2006) (Figure 19). Elle présente une structure homodimérique (monomère de ~13,8 kDa), très similaire à celles des classes 1. Cependant les données spectroscopiques de résonance Raman et de RPE montrent que le site actif de la SOR de *T. pallidum* présente des caractéristiques proches des SORs de classe 2 de type *P. furiosus*. Le signal RPE est plus axial que celui des SORs de classe 1 (Mathé et coll, 2006). D'après les données de résonance Raman, ces différences de géométrie observées par RPE pourraient être associées à des forces de liaison Fe^{3+} -S_{cys} et Fe^{3+} -N_{His} plus fortes pour les SORs de classe 2 et 3 par rapport à celle des SORs de classe 1 (Mathé et coll, 2006).

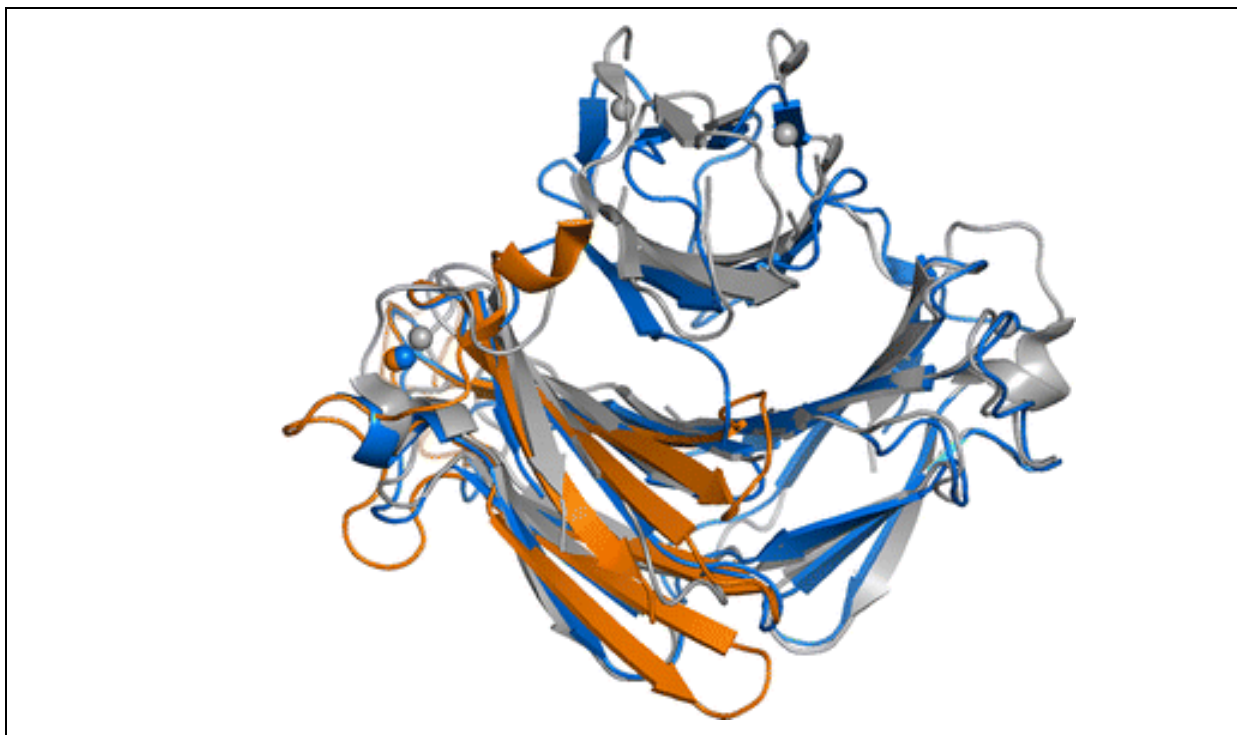


Figure 19 : Superposition des structures 3D des 3 classes de SOR. Structure de l'homodimère de la SOR de *D. baarsii* (gris, SOR de classe 1), du monomère de la SOR de *P. furiosus* (orange, SOR de classe 2) et de l'homodimère de la SOR de *T. pallidum* (bleu, SOR de classe 3).

C. Le cycle catalytique des SORs

1. Réaction avec $O_2^{\bullet -}$

L'étude du mécanisme de réaction de la SOR avec l'anion superoxyde est essentiellement basée sur la technique de cinétique rapide associée à la radiolyse pulsée. Cette technique de radiolyse pulsée couplée à la spectroscopie UV-visible permet, par irradiation d'une solution aqueuse, de générer instantanément une quantité définie de superoxyde et de suivre l'évolution de l'absorbance de la solution protéique au cours du temps. Cela permet d'étudier, sur un cycle catalytique, l'oxydation du site actif de la SOR par $O_2^{\bullet -}$ et permet de mettre en évidence la présence d'intermédiaires réactionnels. Cette technique donne aussi accès aux constantes de vitesse de formation et de disparition des différents intermédiaires et à leurs dépendances à différents paramètres tels que le pH, la concentration du tampon, ainsi que la modification d'un acide aminé par mutagenèse dirigée. Les cinétiques sont obtenues à une longueur d'onde donnée. Les expériences sont répétées à différentes longueurs d'onde entre 450 et 750 nm afin de pouvoir reconstituer les spectres d'absorption UV-visible des différents intermédiaires. Jusqu'à présent, trois différents groupes, dont notre laboratoire, ont étudié le mécanisme d'oxydation de la SOR par $O_2^{\bullet -}$ (Rodrigues et coll, 2006 ; Emerson et

coll, 2002 ; Nivière et coll, 2004). Selon la protéine étudiée, un ou deux intermédiaires réactionnels ont été décrit dans le cycle catalytique des SORs.

Dans tous les cas, quelque soit la SOR étudiée, un premier intermédiaire réactionnel est observé, après la réaction de $O_2^{\bullet-}$ sur le site actif. Les constantes de temps de formation de ce 1^{er} intermédiaire sont toutes du même ordre de grandeur, environ $10^9 s^{-1}.M^{-1}$, et il est formé en 50 μs à pH 7.6. Cette valeur de constante de vitesse est très élevée, proche de la limite de diffusion des molécules en solution. Le spectre de ce premier intermédiaire est très similaire chez toutes les différentes SORs étudiées, avec une large bande d'absorption centrée autour de 600-610 nm (Abreu et coll, 2001 ; Coulter et coll, 2000 ; Lombard et coll, 2001 ; Nivière et coll, 2001). Il est généralement proposé comme étant un fer (hydro)peroxo ($Fe^{3+}-OO(H)$) (Figure 20), résultant de la fixation rapide du superoxyde sur la sixième liaison de coordination libre du fer ferreux, et un transfert simultané d'un électron du fer au superoxyde. Dans toutes les études publiées jusqu'à aujourd'hui, la formation du premier intermédiaire est pH indépendante. Cela suggère que la formation de cet intermédiaire ne fasse pas intervenir de processus de protonation ou que cette protonation n'est pas cinétiquement limitante (Rodrigues et coll, 2006 ; Emerson et coll, 2002 ; Nivière et coll, 2004). Des calculs DFT réalisés à partir du site actif de la SOR suggèrent que la protonation de l'espèce $Fe^{3+}-OO^-$ est énergiquement très favorable, et puisse être cinétiquement non limitante (Dey et coll, 2007).

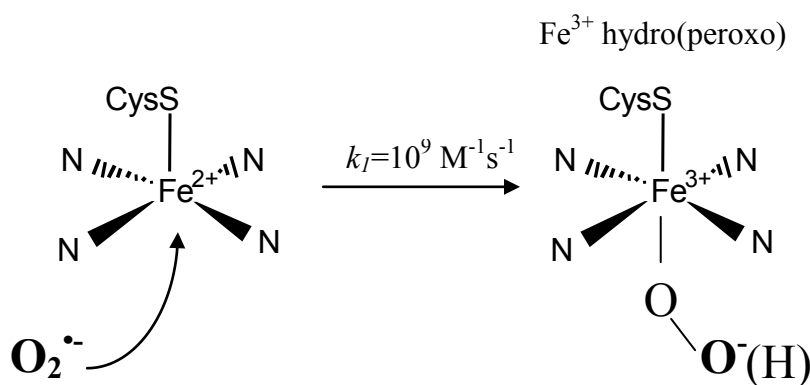


Figure 20 : Mécanisme réactionnel de formation du 1^{er} intermédiaire.

La Lysine 48 est le résidu chargé positivement le plus proche du site actif (voir Figure 12). Sa mutation en isoleucine ou en alanine entraîne un fort ralentissement de la réactivité de la SOR avec le superoxyde (Lombard et coll, 2001 ; Emerson et coll, 2002). La constante de vitesse de formation du 1^{er} intermédiaire est diminuée d'un facteur 30 pour la SOR de *D. baarsii* (Lombard et coll, 2001) et d'un facteur 7 pour celle de *D. vulargis* (Emerson et coll,

2002). Il a été proposé que cette lysine chargée positivement joue un rôle d'attracteur électrostatique pour l'anion superoxyde.

Après la formation du 1^{er} intermédiaire, selon la protéine étudiée, différentes observations ont été rapportées, avec la formation ou non d'un 2nd intermédiaire réactionnel (voir Figure 21, Figure 22 et Figure 23).

A. fulgidus est le seul organisme connu à ce jour qui possède à la fois une 2Fe-SOR et une 1Fe-SOR (Rodrigues et coll, 2007). Le mécanisme réactionnel de ces deux SORs avec l'anion superoxyde ont été étudiées et sont très similaires (Rodrigues et coll, 2006 ; Rodrigues et coll, 2007). Sur ces enzymes, les auteurs considèrent que le 1^{er} intermédiaire est une espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. Il évolue ensuite vers un second intermédiaire, qui à partir de son spectre d'absorption UV-visible, a été caractérisé comme étant une espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$. Il est proposé que l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ résulte de la protonation de l'oxygène proximal de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ par une molécule d'eau ou de H_3O^+ selon le pH, ce qui permettrait la libération d'une molécule de H_2O_2 . Enfin, dans une dernière étape, le résidu glutamate 47 vient se lier au fer en déplaçant le ligand hydroxyde.

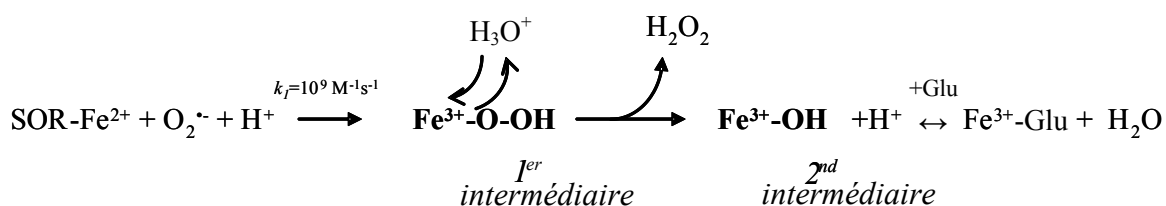


Figure 21 : Mécanisme réactionnel proposé pour la SOR de *A. fulgidus* (Rodrigues et coll, 2006).

Notons que selon ce mécanisme, les deux protons nécessaires pour former H_2O_2 proviendraient directement du solvant, sans faire intervenir de donneurs spécifiques au niveau du site actif de la SOR.

Dans le cas de la SOR de *D. vulgaris* (Coulter et coll, 2000 ; Emerson et coll, 2002 ; Huang et coll, 2007), seul l'intermédiaire réactionnel fer-hydroperoxyde a été observé. L'intermédiaire fer-hydroperoxyde se transforme directement en $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$ en libérant une molécule de H_2O_2 . L'évolution de cet intermédiaire en l'espèce finale oxydée est pH dépendante. La protonation de la liaison Fe-O de l'intermédiaire fer hydroperoxyde est décrite comme étant à la fois une catalyse acide générale et une catalyse acide spécifique selon le pH auquel se déroule la réaction. La protonation peut être réalisée par un ion hydronium (catalyse

acide spécifique) et par l'acide formique (catalyse acide générale) présent du fait de la présence de formiate dans les expériences de radiolyse pulsée (Huang et coll, 2007).

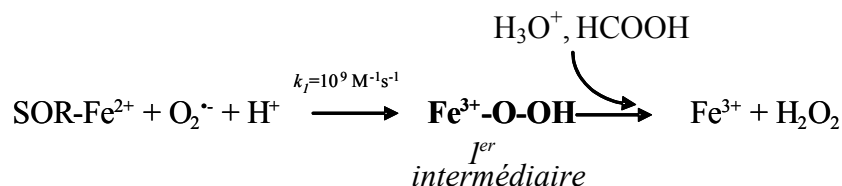


Figure 22 : Mécanisme réactionnel proposé pour la SOR de *D. vulgaris* (Huang et coll, 2007).

Pour cette protéine, aucune évidence de la formation d'un deuxième intermédiaire réactionnel de type Fe-OH n'a été rapportée (Huang et coll, 2007).

Dans le cas de la SOR de *D. baarsii* (Lombard et coll, 2000 ; Nivière et coll, 2001 ; Nivière et coll, 2004), deux intermédiaires ont été observés. Cependant le second intermédiaire possède un spectre d'absorption UV-visible différent de celui caractérisé pour *A. fulgidus*, avec une bande d'absorption très fine centrée à 625 nm, ne correspondant pas à une espèce de type $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$. La formation du second intermédiaire correspond à une étape de protonation. La dépendance au pH de la constante de vitesse de cette étape suggère que le proton provient directement du solvant (H_3O^+). Ce second intermédiaire évolue vers la formation de la forme oxydée de la SOR ($\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$). Cependant la cinétique de cette dernière étape n'a pas pu être étudiée par radiolyse pulsée du fait de l'instabilité de la lampe UV-visible utilisée dans ce montage. Il a été proposé pour la SOR de *D. baarsii* que le 1^{er} intermédiaire soit un fer-peroxo, qui évoluerait, après une première protonation, vers un fer-hydroperoxyde. La dernière étape, non observée correspondrait à une seconde protonation sur le fer-hydroperoxyde, libérant H_2O_2 et la SOR Fe^{3+} finale.

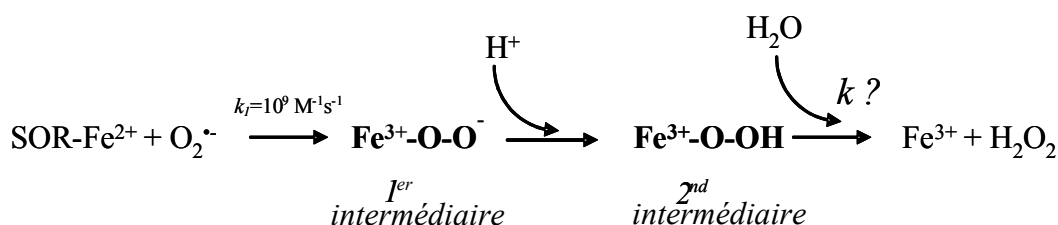


Figure 23 : Mécanisme réactionnel proposé pour la SOR de *D. baarsii* (Nivière et coll, 2004).

Notons que ces différences (voir Figure 21, Figure 22 et Figure 23) quant aux nombres d'intermédiaires réactionnels rapportés par des équipes différentes sur des SORs présentant

des sites actifs très similaires restent difficiles à expliquer. De plus, ces différences observées ne sont pas corrélées aux différentes classes de SOR. Enfin, il faut noter que les propositions sur la nature chimique des intermédiaires réactionnels restent des hypothèses. En effet, les seules informations disponibles quand à la nature de ces intermédiaires sont des spectres UV-visibles reconstitués à partir de données cinétiques. Ces spectres présentent des bandes assez larges, centrées entre 600 et 650 nm et ne sont que relativement informatifs. D'autre part, on peut penser que ces spectres sont dominés par la bande de transfert de charge S-Fe et ne représentent sans doute pas directement des bandes de transfert de charge des intermédiaires fer-peroxyde (Clay et coll, 2002).

2. L'intermédiaire Fe^{3+} -(hydro)peroxo

I Caractéristiques structurales

Du fait de la réaction très rapide de la SOR avec le superoxyde, les intermédiaires réactionnels n'ont pas pu être directement piégés afin de permettre leur caractérisation plus détaillée par d'autres spectroscopies plus informatives que l'absorption UV-visible, telle la résonance Raman par exemple. Sur des complexes de fer, des espèces Fe-OOH ont pu être piégées à basse température, en faisant réagir ces complexes avec un léger excès de H_2O_2 (Girerd et coll, 2000 ; Balland et coll, 2003). Les espèces fer peroxyde ont pu alors être parfaitement bien caractérisées, notamment par résonance Raman, qui permet d'observer les vibrations caractéristiques des liaisons Fe-O et O-O des Fe^{3+} -peroxyde. De façon similaire, en faisant réagir rapidement la SOR avec un léger excès de H_2O_2 , une espèce de type Fe^{3+} -OOH a pu être piégée à basse température et bien caractérisée par spectroscopie de résonance Raman (Mathé et coll, 2002 ; Mathé et coll, 2006 ; Mathé et coll, 2007). Notons que, ces espèces fer-peroxyde ont pu être piégées à partir de SORs mutées, sur les positions E47 (E47A) et E114 (E114A) qui induisent une certaine stabilisation du fer-peroxyde et facilitent leur piégeage par simple congélation. Sur la SOR sauvage, les espèces fer-peroxyde sont plus instables et plus difficiles à observer. Le spectre de résonance Raman de l'espèce Fe-OOH du mutant SOR E114A montre des vibrations $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$ et $\nu(\text{O}-\text{O})$ à 446 et 851 cm^{-1} , respectivement, caractéristiques d'une espèce fer ferrique peroxyde. Le spectre du mutant E47A donne des valeurs assez similaires, avec des vibrations $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$ et $\nu(\text{O}-\text{O})$ à 438 et 850 cm^{-1} , respectivement. Comparativement aux complexes modèles d'espèces Fe^{3+} -OOH, dans le cas de la SOR, la vibration $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$ observée est particulièrement faible alors que la

vibration $\nu(\text{O}=\text{O})$ est plutôt élevée. Cela suggère une liaison Fe-O faible et une liaison O-O forte pour l'espèce Fe-OOH observée dans la SOR (Roelfes et coll, 2003 ; Mathé et coll, 2002 ; Mathé et coll, 2007). Enfin notons que l'espèce Fe^{3+} hydroperoxyde obtenue par réaction de la SOR avec H_2O_2 est haut spin (Mathé et coll, 2002 ; Mathé et coll, 2007).

Notons que les espèces fer-peroxyde ont été formées à partir d'une réaction de la SOR avec H_2O_2 et non avec $\text{O}_2^{\cdot-}$, le substrat naturel de la SOR. Cela est à ce jour la seule façon de piéger ces espèces et d'obtenir des caractéristiques générales des fer-peroxydes que le site actif de la SOR peut accommoder.

Ces espèces de type Fe^{3+} -OOH, ont pu être piégées dans des cristaux de SOR et leurs structures ont été résolues par diffraction des rayons X (Katona et coll, 2007). Ces études ont été réalisées sur le mutant E114A, connu pour stabiliser l'intermédiaire fer peroxyde (Mathé et coll, 2007). Les cristaux obtenus sont formés de quatre molécules de SOR par unité asymétrique, et trois de ces molécules (appelés monomères B, C et D) contiennent une espèce Fe^{3+} -peroxyde (Figure 24).

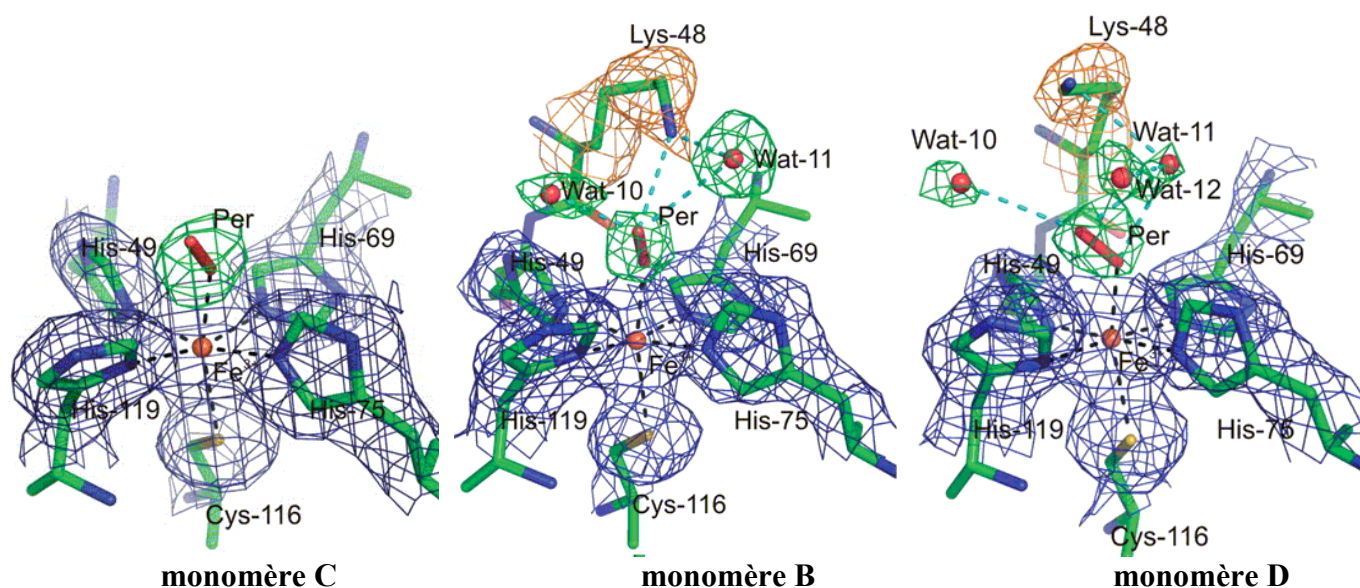


Figure 24 : Structures du site actif de la SOR en présence des trois différents intermédiaires fer-peroxyde, appelés monomère B, C et D (Katona et coll, 2007).

De façon remarquable, les structures des monomères B, C et D présentent trois conformations différentes. Cependant toutes ces structures possèdent un peroxyde linéaire, qui contraint par l'encombrement stérique de la protéine, pointe vers l'His 119. Des calculs DFT effectués sur les structures cristallographiques des monomères B et D favorisent un état haut spin pour le fer-peroxyde avec un proton sur l'oxygène distal. Le monomère C est aussi décrit comme un fer peroxyde de type haut spin mais la protonation du peroxyde n'est pas aussi claire que pour les monomère B et D (Katona et coll, 2007). La SOR contient une

boucle flexible constituée des résidus 45 à 49, incluant la lysine 48 très bien conservée dans l'ensemble des SORs et très exposée au solvant. La position de cette boucle est différente dans les trois structures de fer-peroxyde obtenues. Dans le monomère C, aucune interaction entre la boucle contenant la Lys 48 et le peroxyde n'est observée. Dans le monomère B, la chaîne latérale de la Lys 48 s'est rapprochée du peroxyde, permettant la formation d'un réseau de liaisons hydrogène autour de l'oxygène distal du peroxyde incluant deux molécules d'eau. Enfin, dans le monomère D, la chaîne latérale de la Lys 48 s'est légèrement déplacée en direction du fer. Les deux molécules d'eau sont toujours présentes et l'une d'elle forme à présent une liaison hydrogène avec l'oxygène proximal du peroxyde. Cette molécule d'eau est dans une position favorable pour donner un proton à l'oxygène proximal, permettant aussi la formation et la libération de H_2O_2 (Katona et coll, 2007) (Figure 25).

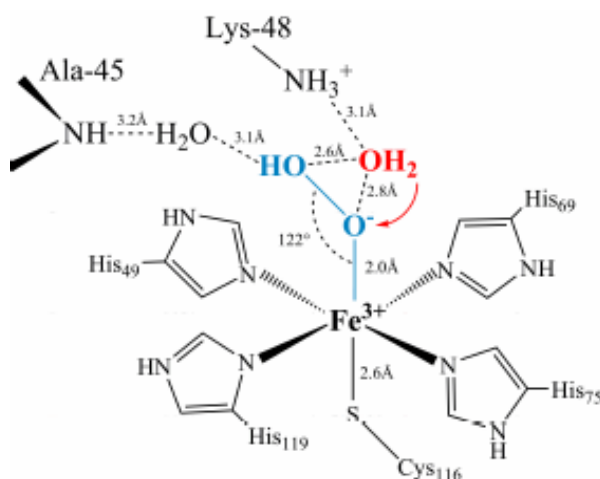


Figure 25 : Structure du monomère D. La protonation de l'oxygène proximal du fer hydroperoxyde est facilitée par le placement optimal d'une molécule d'eau via un réseau de liaisons hydrogène initié par la lys 48.

L'ensemble de ces trois structures suggère un mécanisme d'évolution de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OO(H)}$ du site actif de la SOR vers la formation du produit de la réaction, H_2O_2 (Figure 26).

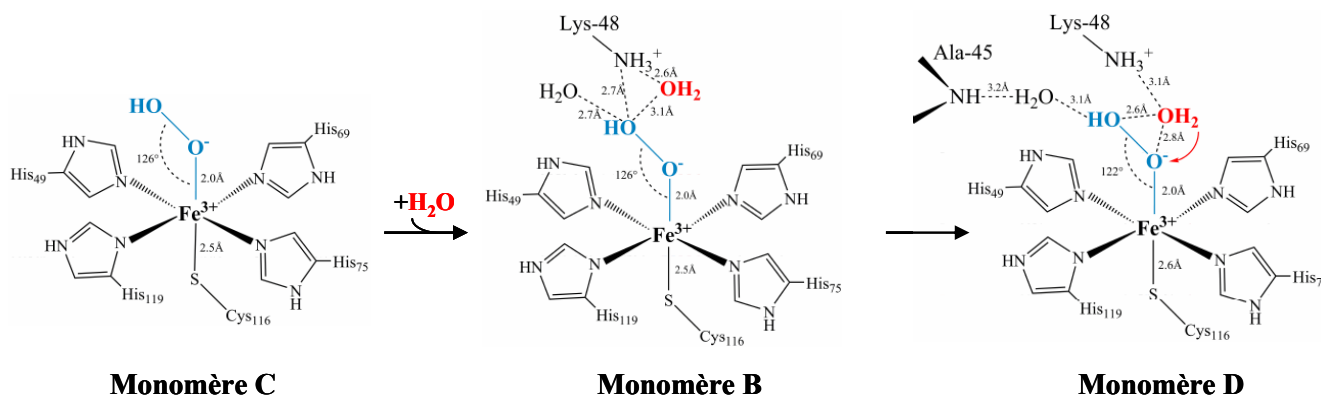


Figure 26 : Evolution proposée du Fer-hydroperoxyde au cours du cycle catalytique de réduction du superoxyde par la SOR d'après les structures cristallographiques de fer-hydroperoxyde de la SOR (Katona et coll, 2007).

Ces structures mettent en évidence le rôle primordial de la Lysine 48, qui permet de positionner une molécule d'H₂O, via un étroit réseau de liaisons hydrogène, à proximité de l'oxygène proximal du peroxyde, et permettre ainsi sa protonation. Notons que jusqu'à présent, ce rôle de la Lys 48 dans la catalyse, n'est basé que sur ces structures aux rayons X (Katona et coll, 2007). A ce jour aucune donnée cinétique n'a permis de mettre en évidence le rôle de la lysine 48 dans l'étape de protonation d'un intermédiaire fer hydroperoxyde au cours du cycle d'oxydation de la SOR par le superoxyde (Lombard et coll, 2001 ; Emerson et coll, 2002 ; Nivière et coll, 2004, Huang et coll, 2007).

2 Rôle du ligand cystéine

La nature utilise des cystéines pour moduler les propriétés électroniques des centres métalliques des métalloprotéines (Lippard et Berg, 1994). La présence de la cystéine, ligand axial dans le site actif de la SOR, fait la particularité de ce site actif. De nombreuses études sur des complexes modèles de la SOR ont recherché à élucider le rôle du ligand thiolate dans le mécanisme de réduction du superoxyde (Dey et coll, 2007 ; Kitagawa et coll, 2006 ; Kovacs et Brines, 2007). Ainsi, sur des complexes de fer analogues au site actif de la SOR, il a été montré que la présence du ligand thiolate diminue significativement le potentiel redox de l'ion métallique (Kitagawa et coll, 2006).

Les complexes modèles de la SOR formant l'intermédiaire Fe³⁺-OOH ont également été obtenus et l'influence du thiolate dans la réactivité de cet intermédiaire a été étudiée (Bukowski et coll, 2005 ; Dey et coll, 2007 ; Kitagawa et coll, 2006 ; Kovacs et Brines, 2007 ; Namuswe et coll, 2008). Ces études montrent que la présence d'un ligand thiolate est capable

de moduler significativement la force de la liaison Fe-O (Namuswe et coll, 2008). Ces travaux montrent également qu'un ligand thiolate en *trans* du peroxyde diminue le potentiel redox de l'intermédiaire fer-peroxyde et augmente son pKa, facilitant ainsi sa protonation (Bukowski et coll, 2005 ; Dey et coll, 2007 ; Kovacs et Brines 2007).

Pour résumer, d'après les études réalisées sur les complexes modèles de la SOR, la cystéine ligand axial du fer du site actif peut donc jouer un rôle primordial dans la répartition de la densité électronique sur l'ion métallique. Elle peut favoriser le transfert d'électrons du Fe^{2+} au superoxyde ainsi que la formation de H_2O_2 à partir de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$.

L'étude du rôle de cette cystéine au sein du site actif de la SOR a également été réalisée sur la protéine SOR de *D. baarsii*. Le glutamate 114 interagit avec la cystéine du site actif par une interaction de type dipolaire (Figure 27) (Berthomieu et coll, 2002). Il a été montré que cette interaction permet de moduler finement la force de liaison Fe-SCys du site actif. La mutation E114A entraîne un affaiblissement de la liaison Fe-SCys (Mathé et coll, 2007). Cette diminution de la densité électronique sur le fer a pour conséquence de renforcer la liaison Fe-O de l'intermédiaire peroxyde et d'augmenter sa stabilité dans le site actif de la SOR. C'est sur ce mutant que les intermédiaires fer-peroxyde ont pu être piégés dans les structures de SOR (Katona et coll, 2007). Lors de la réaction avec $\text{O}_2^{\bullet-}$, le renforcement de la liaison Fe-O de l'intermédiaire fer-peroxyde induit une diminution de la valeur du pKa et rend plus difficile la protonation de son oxygène proximal qui permet la formation de H_2O_2 (Mathé et coll, 2007).

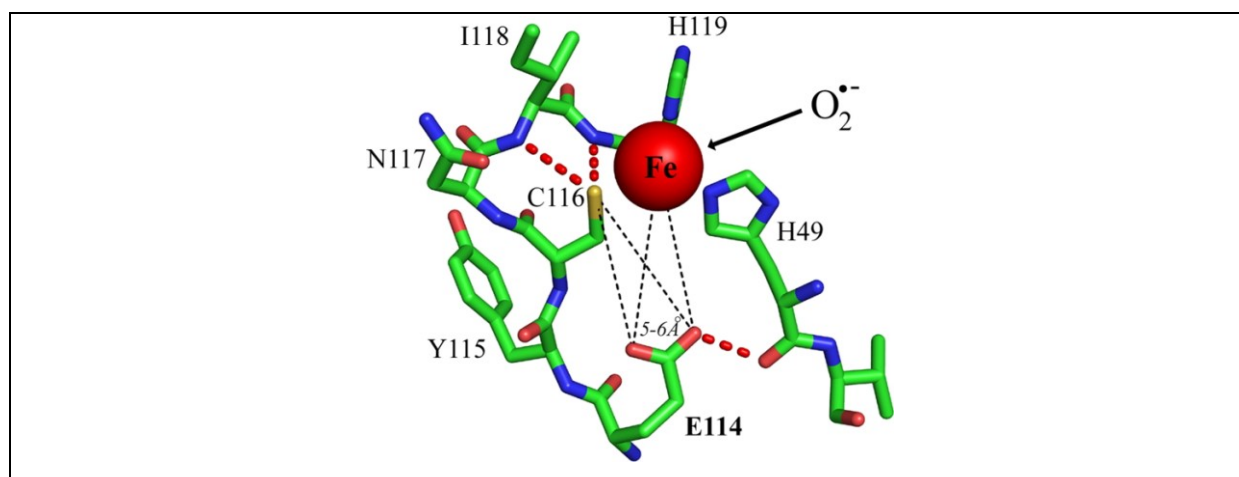


Figure 27 : Structure du site actif de la SOR de *D. baarsii* qui met en évidence la proximité du Glutamate 114 par rapport à la liaison Fe-S.

Ce travail sur le mutant E114A permet de voir l'importance de la force de la liaison Fe-S dans la réaction avec le superoxyde. Il apparaît que cette liaison contrôle directement la

force de la liaison Fe-O ainsi que la valeur du pKa de l'intermédiaire fer-peroxy formé durant la catalyse. Ces deux facteurs sont essentiels dans la formation du produit de la réaction, H_2O_2 correspondant à la protonation de l'intermédiaire peroxy et la rupture de la liaison Fe-O. Ainsi le rôle essentiel du ligand thiolate dans la catalyse, mis en avant par les études sur les modèles de SOR, est confirmé par les études sur la protéine.

3 Réactivité des espèces de type $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$

Le site actif de la SOR présente des similitudes avec celui de certaines oxygénases hémiques, comme la Nitrique Oxyde Synthase (NO), l'Hème Oxygénase ou le Cytochrome P450 (Cyt P450), avec une coordination de type FeN_4S_1 (Figure 28). Cependant dans le site actif de la SOR, les quatre ligands azotés sont fournis par quatre chaînes latérales d'histidines alors qu'ils le sont par une porphyrine pour les NOs et les Cyt P450 (Denisov et coll, 2005). L'activité catalytique de la SOR et de ces systèmes oxygénases hémiques est très différente. La SOR permet de lutter contre le stress oxydant en catalysant la réduction du superoxyde alors que les oxygénases sont impliquées dans des mécanismes d'activation de l'oxygène pour catalyser des réactions d'oxydation d'une large gamme de substrats.

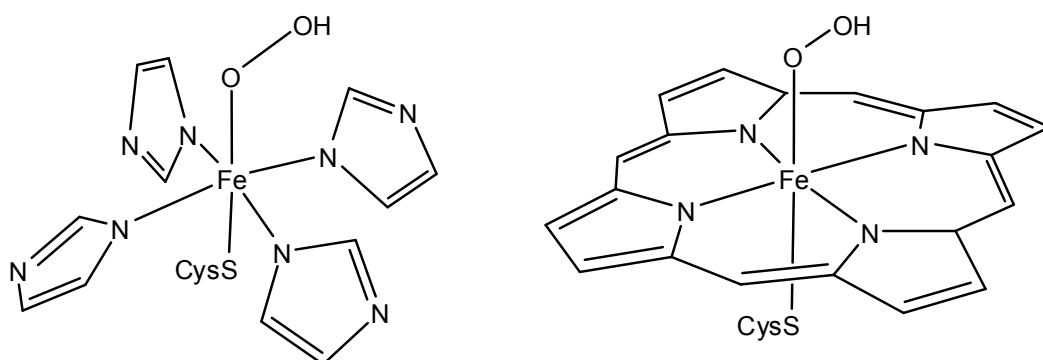


Figure 28 : Schéma des intermédiaires réactionnels fer peroxyde de la SOR (gauche) et celui du Cyt P450 (droite).

De façon intéressante, les SORs et les oxygénases hémiques forment au cours de leur cycle catalytique un même type d'intermédiaire réactionnel fer-peroxyde, $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, mais orientent son évolution de façon très différente. Selon que le clivage du $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ se fait sur la liaison Fe-O ou sur la liaison O-O, les espèces formées sont respectivement un Fe^{3+} et H_2O_2 dans le cas de la SOR et un fer-oxo (Fe=O) et H_2O dans le cas du cytochrome P450 (Dey et coll, 2007) (Figure 29). La rupture de la liaison Fe-O résulte de la protonation de

l'oxygène proximal, la cassure O-O de la protonation de l'oxygène distal. Dans le cas des oxygénases, on a donc formation d'une espèce oxydante très réactive, capable d'oxygéner ou hydroxyler différents substrats. Dans le cas de la SOR, on a formation d'une espèce ferrique finale peu réactive et libération du produit de réaction, H_2O_2 qui sera éliminé par les catalases et peroxydases. Ainsi la SOR permet de lutter contre des espèces oxydantes alors que les oxygénases génèrent des espèces très oxydantes.

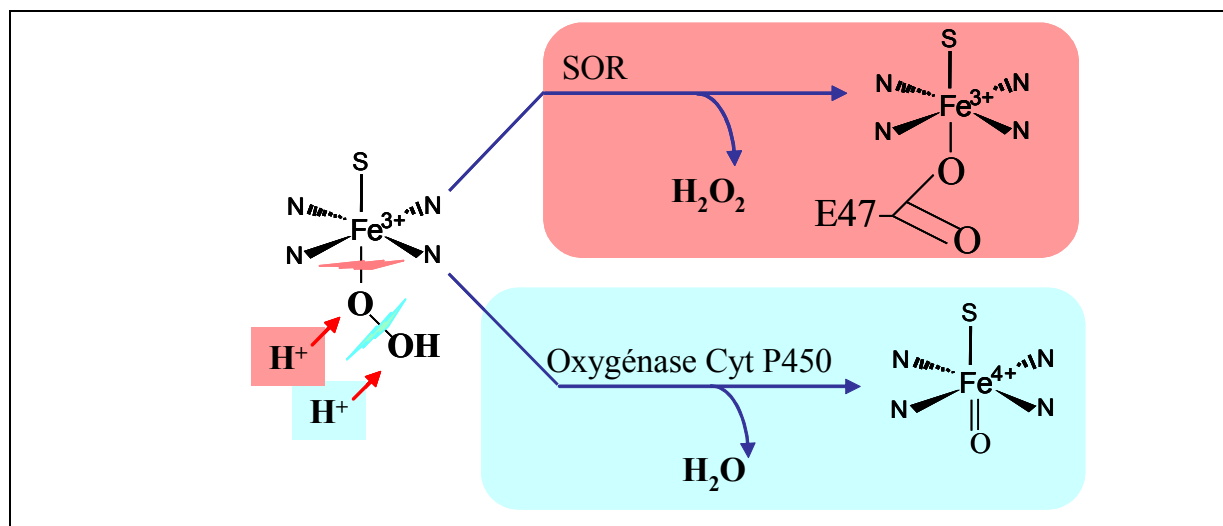


Figure 29: Comparaison de la réactivité de l'intermédiaire Fe-OOH de la SOR (rose) à celui du Cytochrome P450 (bleu).

Pourquoi, la nature utilise des sites actifs similaires pour apparemment des fonctions opposées ? Plusieurs caractéristiques différencient ces deux sites actifs et semblent jouer un rôle important dans l'orientation de la réaction. Tout d'abord, le fer de l'espèce Fe-OOH du Cytochrome P450 est bas spin alors que celui de la SOR est haut spin (Bukowski et coll, 2005). D'après les données de résonance Raman, dans le cas de la SOR, la liaison Fe-O est faible et la liaison O-O est forte (Mathé et coll, 2007), en comparaison avec les complexes modèles de fer-hydroperoxyde existant. Cela favorise la formation de H_2O_2 et évite la formation de fer-oxo (Roelfes et coll, 2003). Par ailleurs, la présence dans le cas du Cyt P450 d'un hème permet une délocalisation des charges du métal. Les calculs DFT démontrent l'importance de la porphyrine pour stabiliser une espèce fer-oxo au sein du Cyt P450 sous forme $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, radical porphyrinyle (Dey et coll, 2007).

Il est intéressant de remarquer que ces deux sites possèdent un ligand soufré en *trans* du peroxyde. Des complexes métalliques mimant l'intermédiaire réactionnel Fe-OOH de la SOR et du Cyt P450 montrent que la présence d'un ligand fortement électrodonneur comme le soufre, en *trans* du peroxyde va jouer un effet stabilisateur pour le peroxyde dans le cas où le complexe est haut-spin (cas de la SOR) et un effet déstabilisateur dans le cas où le complexe

est bas-spin (cas des Cyt P450) (Bukowski et coll, 2005). Pour ces derniers on observe un effet « push » du soufre qui favorise la rupture de la liaison O-O de l'espèce fer-péroxyde (Sono et coll, 1996). L'effet opposé du ligand soufré sur la stabilité des espèces fer-péroxyde haut-spin et bas-spin observé sur les complexes modèles pourrait donc expliquer pourquoi la nature utilise un site similaire pour deux enzymes aux rôles apparemment très distincts (Bukowski et coll, 2005).

Objectifs de la Thèse

Les deux objectifs majeurs de cette thèse ont été, d'une part de comprendre le rôle du Centre I dans l'activité superoxyde réductase de la SOR et d'autre part de préciser le mécanisme réactionnel de la SOR avec le superoxyde.

Nous avons étudié le rôle du Centre I de la SOR de *D. baarsii* dans l'activité superoxyde réductase et plus particulièrement dans le transfert des électrons des réductases cellulaires vers le site actif de la SOR. Ce rôle de relais électronique du Centre I a pu être mis en évidence notamment à l'aide d'un mutant de la SOR de *D. baarsii* ne possédant pas ce centre.

Puis nous avons étudié le mécanisme réactionnel de la SOR avec le superoxyde. Les études réalisées auparavant sur la SOR de *D. baarsii* comportaient deux biais. Le premier était dû à la présence d'un effet photochimique durant les expériences de radiolyse pulsée, le second aux trop faibles concentrations de superoxyde généré durant les expériences de radiolyse pulsée. A ces concentrations, une seule cinétique apparaissait là où il y en avait deux. Après avoir caractérisé l'effet photochimique, les conditions d'étude du mécanisme de la SOR avec le superoxyde en cinétique rapide ont été redéfinies. L'étude du mécanisme réactionnel a été réalisée en absence de l'effet photochimique, dans des conditions permettant de voir l'ensemble des cinétiques sur la SOR sauvage et ses mutants. Ces études nous ont permis de proposer un mécanisme réactionnel de réduction du superoxyde par la SOR. Elles ont également permis de mettre en évidence le rôle important que joue la Lysine 48 dans la réduction du superoxyde par la SOR.

Enfin nous avons initié l'étude des propriétés oxydantes des espèces Fe^{3+} -peroxydes formées au sein du site actif de la SOR de *D. baarsii* et de ces mutants. Ces études mettent en évidence que des mutations de résidus appartenant à la seconde sphère de coordination du fer, comme la lysine 48 mais également le glutamate 47, entraînent une modification profonde de la réactivité de l'espèce Fe^{3+} -peroxyde formée au sein du site actif de la SOR. Ces mutants de la SOR, en présence de H_2O_2 , sont en effet capables de réaliser des réactions d'oxydation spécifiques, telle la transformation de thioanisole en méthyl phényl sulfoxyde.

Chapitre II : **Matériels et méthodes**

I. Matériels Biologiques

A. Souches bactériennes

♦ Escherichia coli BL21(DE3)

Ces bactéries ont le génotype suivant : F-*ompT hsdS_B* (r_B^- , m_B^-) *gal dcm* (DE3). Ce système est utilisé pour la surproduction de protéines dont les gènes sont sous la dépendance de promoteurs de phage T7. L'insert chromosomique DE3 est issu du phage λ et contient le gène codant pour la T7 RNA polymérase. Il est sous contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible par l'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG).

♦ Escherichia coli DH5 α

Ces bactéries ont le génotype suivant : F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 *recA1 endA1 gyrA95 thi-1, hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *supE44 relA1 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169. Cette bactérie est utilisée pour la préparation de plasmides. Elle est déficiente en endonucléases (*endA*), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologue, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

B. Vecteur de surexpression

pJF119EH : Ce vecteur est un dérivé du plasmide pKK223-3 (Pharmacia). C'est un plasmide à large spectre d'hôte qui possède un site de polyclonage (MCS) avec en amont le promoteur *ptac* inductible par l'IPTG. Ce plasmide porte le gène *lac I^q*, permettant son utilisation dans des souches ne possédant pas le répresseur *lac I* du promoteur *lac*.

pMJ25 : Ce vecteur résulte de l'insertion d'une partie de l'opéron *rbo-rub* de *Desulfoarculus baarsii* entre les sites *EcoRI* et *HindIII* du MCS de pJF119EH. La portion d'ADN ainsi insérée contient la totalité du gène *rbo* (381 pb) codant pour la SOR et 103 pb de la partie 5' du gène *rub* codant pour la rubrédoxine (Pianzzola et coll, 1996).

Série pMJ25 : Les vecteurs de cette série résultent de mutations ponctuelles effectuées par mutagenèse dirigée au sein du gène de la SOR de *Desulfoarculus baarsii* (Figure 30) (Lombard et coll, 2001).

pETVNTP : Ce vecteur résulte de l'insertion du gène de *Treponema pallidum* entre les sites *NdeI* et *BamHI* du MCS du vecteur pET3a (Tableau II. 1). Les plasmides de la série pET possèdent un promoteur fort de T7 en amont d'un site de clonage de gène. La surexpression du gène placée sous le contrôle du promoteur T7 se fait uniquement par l'ARN polymérase du bactériophage T7. Elle présente des taux de transcription plusieurs fois supérieurs à l'ARN polymérase de *E. coli*. La surexpression de gène placée sous le contrôle du promoteur T7 nécessite l'expression de la T7 ARN polymérase. Dans notre cas, ce gène a été intégré au génome de *E. coli* (DE3) et est placé sous le contrôle du promoteur lac inductible par l'IPTG.

Plasmides	Mutations	Taille du plasmide et résistance	Taille de l'insert et les sites de restriction
<i>D. baarsii</i> Série pMJ25			
pMJ25 <i>D. baarsii</i>	SOR sauvage	5784 pb pJF119EH Ampicilline résistant	484 pb <i>EcoRI</i> et <i>HindIII</i>
pMLE47A <i>D. baarsii</i>	Glu47Ala		
pMLK48I <i>D. baarsii</i>	Lys48Ile		
pCWE114A <i>D. baarsii</i>	Glu114Ala		
pDBA45K <i>D. baarsii</i>	Ala45Lys		
pDBC13S <i>D. baarsii</i>	Cys13Ser		
<i>T. pallidum</i> Série pETVNTP			
pETVNTP <i>T. pallidum</i>	SOR sauvage	5029 pb pET3a Ampicilline résistant	429 pb <i>NdeI</i> et <i>BamHI</i>
pTPK49I <i>T. pallidum</i>	Lys49Ile		

Figure 30 : Tableau récapitulatif des plasmides codants pour les gènes des SORs sauvages et mutantes de *T. pallidum* et *D. baarsii*. En gris les plasmides réalisés pour cette étude.

C. Milieux de culture

Le milieu LB (10 g/L tryptone, 5 g/L extrait autolytique de levure (Biokar Diagnostic), 10 g/L NaCl, pH 7) est utilisé pour la pré-culture des souches transformées par les plasmides de la série pMJ25 et pETVNTP. Il est également utilisé pour les cultures en milieu solide (milieu LB top Agar).

Le milieu minimum M9 (6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L NaCl, 1 g/L NH₄Cl, pH 7) supplémenté en sels minéraux (2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM Fe(SO₄)₂) et en molécules organiques (0.4 % glucose, 1 g/L casaminoacids, 2 mg/L thiamine) est utilisé pour la culture des souches de *E. coli* transformées par les plasmides de la série pMJ25 et pETVNTP.

II. Méthodes de biologie moléculaire

A. Introduction d'ADN plasmidique dans *E. coli*

1. Préparation des cellules compétentes

10 mL de LB sontensemencés avec une colonie de bactéries BL21(DE3) ou DH5 α , poussée sur une boîte de Petri LB et ampicilline (100 μ g/mL). Les cellules sont alors cultivées à 37 °C sous agitation jusqu'en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}} = 0,5$). La croissance est arrêtée en plaçant les cultures dans la glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 5000 rpm, les culots sont repris dans 5 mL de tampon 10 mM Tris/HCl pH 7.6, NaCl 50 mM. Les cellules sont de nouveau centrifugées à froid à la même vitesse, puis resuspendues dans 5 mL de CaCl₂ 100 mM et maintenues à 4 °C pendant 30 minutes. Le traitement des cellules par les ions divalents Ca²⁺ altère les membranes en créant des microperforations dans la bicouche lipidique, ce qui facilite la transformation par un ADN exogène. Après une nouvelle centrifugation, les bactéries sont reprises dans 1 mL de CaCl₂ 100 mM, 10% glycérol. Les cellules compétentes ainsi obtenues sont aliquotées par 200 μ L ou 400 μ L, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C avant utilisation.

2. Purification d'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à l'aide du kit QIAprep® Miniprep (Qiagen) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 10 mL de culture de cellules transformées avec le plasmide désiré. Après collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline, en présence de ARNase, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique par l'acide acétique. L'ADN est alors éliminé par centrifugation et le surnageant déposé sur une colonne comportant une membrane constituée de gel de silice, permettant une absorption sélective de l'ADN plasmidique, en présence d'une forte concentration en sel.

Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon de faible force ionique (eau). L'ADN ainsi purifié peut être quantifié par spectrophotométrie UV-visible à 260 nm. Une absorbance de 1 correspond à une concentration d'ADN de 50 ng/μL. L'ADN plasmidique purifié est stocké à – 20 °C.

3. Transformation des cellules compétentes

Dans un tube eppendorf stérile, 100 μL de cellules compétentes sont incubés à 4 °C en présence de 50 à 100 ng d'ADN plasmidique pendant 30 minutes. Un choc thermique, réalisé à 42 °C pendant 1 min 30 s, permet la transformation des bactéries. En effet, ce traitement accentue la déstabilisation de la bicouche lipidique et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Celles-ci sont ensuite incubées 2 minutes à 4 °C, puis reprises dans 500 μL de milieu LB et laissées 1 heure sous agitation à 37 °C. Les cellules transformées sont étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar, additionné des antibiotiques appropriés (ici ampicilline 100 μg/mL). Les boîtes sont placées une nuit à 37 °C. Les colonies formées sont celles contenant le vecteur de surexpression.

B. Mutagenèse dirigée

La réalisation de mutants ponctuels sur les gènes de SORs est effectuée avec le kit de mutagenèse dirigée QuickChangeTM (Stratagene). Le principe de ce kit consiste à amplifier par PCR le vecteur plasmidique double brin contenant la séquence à muter à l'aide de deux oligonucléotides synthétiques complémentaires, ceux-ci contenant la mutation désirée. Ils s'hybrident au niveau de la zone à modifier et permettent d'initier la réplication totale du vecteur double brins par la DNA polymérase Pfu ultra (Stratagène).

1. Choix des amorces

La détermination de la séquence des deux oligonucléotides synthétiques se fait selon les indications du kit de mutagenèse dirigée QuickChangeTM (Stratagene). La séquence se doit d'être complémentaire du brin d'ADN à modifier, à l'exception de la mutation désirée. Elle doit contenir entre 25 et 45 bases, avec une température de fusion (T_m) supérieure ou égale à 78 °C.

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ (non appariement)}$$

Avec N le nombre de base de la séquence, % GC étant le pourcentage de bases G et C dans la séquence et % (non appariement) correspond au nombre de bases mutées (valeur nulle en cas de délétion ou d'insertion de base). La séquence choisie devra contenir au moins 40% de bases GC et se terminer par un C ou un G.

Mutation désirée	Séquences des amorces PCR
<i>D. baarsii</i>	
Ala 45 Lys	5'- C ACC GTC GAT GCG AAG AAG GAA AAG CAC GTG -3'
Cys13 Ser	5'- C AAA TGT GAG GTT TCC GGA AAC ATC GTC G -3'
<i>T. pallidum</i>	
Lys 49 Ile	5'- GCA GCG AAG GAA ATT CAT ATC CCC GTG G -3'

Figure 31 : Séquences des amorces de PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée sur les gènes *sor* des SORs de *T. pallidum* et *D. baarsii*. Les bases mutées sont indiquées en gras.

2. Amplification de plasmide

L'amplification en chaîne par l'ADN polymérase (PCR) permet de synthétiser des fragments d'ADN ou des plasmides entiers. Elle s'effectue en utilisant deux oligonucléotides qui vont servir d'amorces, une matrice d'ADN et une ADN polymérase thermorésistante. La réaction consiste en une répétition de 3 étapes qui forment un cycle de température : une étape de dénaturation (séparation des 2 brins de l'ADN matrice), une étape d'hybridation (appariement des amorces à leur séquence complémentaire sur la matrice d'ADN) et une étape d'élongation (synthèse de l'ADN complémentaire par la polymérase).

Les plasmides pMJ25 et pETVNTTP ont servi de matrice pour l'amplification par PCR à partir de 2 oligonucléotides contenant la mutation désirée, chacun étant complémentaire d'un des 2 brins d'ADN du plasmide. La polymérase utilisée est la Pfu ultra (Stratagene), capable de synthétiser des brins d'ADN de grande taille (jusqu'à 9 kb). A la différence des brins d'ADN synthétiques, les brins parentaux sont issus d'un système d'expression bactérien et présentent donc des méthylations au sein de leur séquence. L'ajout de l'endonucléase DpnI, spécifique des brins d'ADN méthylés, permettra de dégrader l'ADN parental non muté. Les plasmides doubles brins linéaires que l'on obtient après digestion avec DpnI sont transformés dans une souche de *E. coli*.

Dans un eppendorf stérile, on mélange 5 μL de plasmide parental, 1 μL de chacune des deux amorces concentrées à 50 μM , 1 μL de mélange de dNTP concentrés à 10 mM, 5 μL de tampon de réaction, 1 μL de polymérase Pfu ultra (2.5 U/ μL) et 38 μL d'eau stérile. Durant la PCR, la première étape de dénaturation est réalisée à 95 °C pendant 30 secondes. Elle est suivie de 18 cycles consécutifs dans lesquels se succèdent une étape de dénaturation de 30 secondes à 95 °C, une étape d'hybridation de 1 minute à 55 °C et une étape d'élongation de 10 minutes à 68 °C. Afin de s'assurer que toutes les élongations soient terminées, une dernière étape est effectuée pendant 10 minutes à 68 °C. Les produits de PCR sont digérés après ajout de 1 μL DpnI (10 unités) et incubés 1h30 à 37 °C.

3. Analyse des produits PCR : gel d'agarose et séquençage

L'ADN plasmidique obtenu après l'amplification par PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Un volume de tampon de charge (0,25 % de bleu de bromophénol, 2,25 % de xylène cyanol, 30 % de glycérol) est ajouté à cinq volumes de solution d'ADN. Le mélange est déposé sur gel d'agarose, de même que des marqueurs de taille allant de 250 à 10000 pb (Fermentas). Après migration sous une tension de 130 mV dans du tampon TAE (Tris 20 mM, acétate 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,3) pendant 20 minutes environ, le gel est plongé dans une solution de BET afin de révéler l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et la fluorescence du complexe formé est révélée sous lumière UV ($\lambda = 260 \text{ nm}$). La comparaison avec les marqueurs de taille permet de déterminer l'ordre de grandeur de la taille du fragment d'ADN étudié.

L'ADN plasmidique contenant a priori la mutation désirée est alors extrait et purifié puis séquencé par la société COGENICS (Meylan, France) afin de vérifier l'intégrité de la séquence du gène muté.

III. Technique de Biochimie

A. Purification des protéines

1. Surexpression des protéines

La souche *E. coli* BL21(DE3) est transformée par l'un des plasmides pMJ25 ou pETVNTP suivant la protéine à surexprimer. Les transformants sont sélectionnés sur milieu

LB-agar, contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Une colonie isolée sur boîte de Pétri est alors mise en culture dans 200 mL de milieu LB complémenté par de l'ampicilline (100 µg/mL). Après une incubation d'une nuit à 37 °C, sous agitation (180 rpm), cette pré-culture sert alors à ensemencer à 1%, 10 Litres de milieu M9 contenant les mêmes antibiotiques et supplémentés en sels minéraux et en molécules organiques (1 M MgSO₄, 0.1 M CaCl₂, 2 mg/mL de thiamine, 100 g/L de casaminoacide, 20 % de glucose et 0.1 mM FeCl₃). La culture se poursuit à 37 °C. Lorsque la densité optique à 600 nm des cultures atteint 0,5, l'expression de la protéine SOR est induite par ajout d'une solution d'IPTG (concentration finale 1 mM). Après 5 heures d'induction à 37 °C, les culots bactériens sont récupérés par centrifugation à 4000 rpm pendant 30 min, à 4 °C puis lavés avec du tampon 10 mM Tris/HCl pH 7,6.

2. Préparation des extraits protéiques

Le culot bactérien est suspendu dans 3 volumes (poids/volume) de tampon 100 mM Tris/HCl pH 7,6. La suspension bactérienne est alors soumise aux ultrasons (Amplitude 40) à 4 °C, par pulses de 10 sec pendant 15 minutes afin de lyser les cellules.

Les extraits cellulaires lysés sont ultracentrifugés à 45 000 rpm à 4 °C pendant 1h30 (Rotor Berkman, TI50), ce qui permet de séparer les extraits solubles des vésicules membranaires. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré et dialysé à 4 °C afin d'éliminer les sels. Le boudin de dialyse est placé 3 h dans 5 litres d'eau et l'eau est renouvelée toutes les heures. L'échantillon est ensuite centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm et le surnageant est récupéré et placé à 4 °C.

Les extraits solubles de *E. coli* contenant les SORs de *D. baarsii* et de *T. pallidum* présentent une bande intense sur gel SDS-PAGE à environ 14 kDa. D'après l'intensité de cette bande, la quantité de SOR est estimée à environ 8-10 % des protéines solubles totales.

Les extraits de la SOR de *D. baarsii* ont une couleur rose pâle qui s'intensifie et devient rouge au bout de quelques minutes à la suite de l'oxydation du Centre I [Fe(SCys)₄] (Moura et coll, 1990 ; Tavares et coll, 1994). Ceci indique que le Centre I de la SOR est à l'état réduit Fe²⁺ dans la bactérie. Le Centre II est, lui, stable à l'oxygène sous la forme réduite.

Les extraits de la SOR de *T. pallidum* sauvage ont une couleur bleue pâle, provenant du site actif légèrement oxydé en présence d'O₂.

3. Etapes chromatographiques

Toutes les étapes de purification des protéines sont réalisées à 4 °C.

♦ *Chromatographie par échange d'anions*

Les extraits de protéines solubles sont déposés à un débit de 1 mL/min sur une colonne Q sepharose ($\varnothing = 24$ mm, $h = 120$ mm) équilibrée avec 3 volumes de tampon 10 mM Tris/HCl à pH 7,6. La colonne est lavée à un débit de 2 mL/min avec du tampon 10 mM Tris/HCl à pH 7,6 jusqu'à un retour à zéro de l'absorbance à 280 nm. L'élution des protéines fixées à la colonne est réalisée au même débit par un gradient linéaire de 0 à 125 mM de NaCl en 10 volumes colonne. Les fractions de 4 mL sont analysées par spectroscopie d'absorption UV-visible. Pour la SOR de *D. baarsii*, les fractions sont rassemblées en fonction de leur rapport entre les absorbances à 280 nm et à 503 nm (longueur d'onde caractéristique du Centre I à l'état oxydé). Le rapport DO_{280}/DO_{503} est révélateur de la pureté de la protéine (Moura et coll, 1990). Les fractions dont ce rapport est < 15 sont conservées. Pour les SORs ne possédant pas de Centre I (mutant C13S de la SOR de *D. baarsii* et SOR de *T. pallidum*), les fractions sont rassemblées en fonction de leur rapport entre les absorbances à 280 nm et 644 nm en présence de chlorure d'iridium (longueur d'onde caractéristique du Centre II à l'état oxydé). Le rapport DO_{280}/DO_{644} est révélateur de la pureté de la protéine. Les fractions dont ce rapport est < 30 sont conservées. Les fractions rassemblées sont ensuite concentrées dans une cellule Diaflo sur une membrane Amicon YM10 sous pression d'argon.

♦ *Chromatographie par filtration sur gel*

Cette étape de purification consiste à réaliser un tamisage moléculaire. Les différents constituants de l'échantillon sont donc séparés selon leur poids moléculaire. Le fractionnement de la Superdex 75 (Pharmacia) se situe entre $3 \cdot 10^3$ Da et $7 \cdot 10^4$ Da.

La solution protéique obtenue après purification sur Q sepharose est chargée sur la colonne Superdex 75 ($\varnothing = 16$ mm, $h = 600$ mm) équilibrée avec du tampon 10 mM Tris/HCl pH 7,6, puis éluee avec ce même tampon à un débit de 0.6 mL/min. Au maximum, 60 mg de protéine sont déposés sur la colonne Superdex 75. Des fractions de 2.4 mL sont collectées puis analysées par spectroscopie d'absorption UV-visible. Les fractions dont le rapport DO_{280}/DO_{503} est < 8 sont conservées. Pour les SORs ne possédant pas de Centre I, les fractions dont le rapport DO_{280}/DO_{644} est < 15 sont conservées. Les fractions rassemblées sont ensuite concentrées dans une cellule Diaflo sur une membrane Amicon YM10 sous pression

d'argon. Les échantillons concentrés sont aliquotés et stockés à -80°C . Les protéines obtenues à l'issue de cette étape sont pures à 90 %.

4. Bilan de la purification des SORs

Au cours des étapes d'extraction et de purification, la SOR est isolée non pas sur la base de son activité enzymatique mais selon les critères de teneur en cofacteurs métalliques, au cours de la purification. Les rapports $\text{DO}_{280/503}$ et $\text{DO}_{280/644}$ diminuent car la proportion de SOR dans la fraction protéique récoltée augmente. Pour la SOR de *D. baarsii* pure, le rapport $\text{DO}_{280/503}$ est de 4.5 (Lombard et coll, 2000). Pour la protéine de *T. pallidum* sauvage pure, le rapport $\text{DO}_{280/644}$ est de 9 (Lombard et coll, 2000).

B. Analyses Biochimiques

1. Dosage des protéines

♦ Dosage des Protéines solubles

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Bradford 1976), à l'aide de la solution commerciale "Biorad Protein Assay" (Biorad). Cette technique est basée sur le changement de coloration à 595 nm du bleu de Coomassie, qui passe du rouge au bleu en se fixant aux protéines. La sérum albumine de bœuf sert à la réalisation de la gamme étalon.

♦ Dosage spectrométrique sur les SORs natives et les mutants de *D. baarsii*

La Figure 32 rassemble l'ensemble des maximums d'absorption observés pour les différents mutants ainsi que leurs coefficients d'extinction molaire respectifs calculés après oxydation par K_2IrCl_6 à pH 7.6.

SOR	Centre II à pH 7.6 Maximum d'absorption à l'état oxydé	$\epsilon_{\text{Centre II}}$ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$
<i>D. baarsii</i>		
sauvage	644 nm	1.9
E47A	560 nm	1.6
E114A	644 nm	1.6
K48I	620 nm	1.8
<i>T. pallidum</i>		
sauvage	650 nm	2.3

Figure 32: Maximums d'absorption UV-visible et coefficients d'extinctions molaires des sites actifs des SORs après oxydation par K_2IrCl_6 .

2. Electrophorèse SDS-PAGE

La pureté de la protéine est analysée après chaque étape par SDS-PAGE. Les échantillons protéiques à analyser sont dilués dans 2 à 6 volumes de tampon de dénaturation (60 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 25% glycérol, 0.2% de bleu de Bromophénol, et 0 à 5 % de β -mercaptoéthanol) et chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Concernant les cellules, 1 mL de culture est centrifugé à 15 000 rpm pendant 2 minutes. Le culot bactérien est repris dans 50 à 100 μL de tampon de dénaturation et chauffé à 100 °C pendant 5 minutes. Après chauffage, tous les échantillons sont centrifugés 15 000 rpm pendant 5 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide à 15 %.

Constituants	Gel de séparation 15 %	Gel de concentration
Acrylamide/Bisacrylamide	3 mL	0,85 mL
Tris-Base 1 M pH=8,8	1,8 mL	---
Tris/HCl 1 M pH=6,8	---	0,78 mL
Glycérol 50 %	1,2 mL	---
Eau distillée	---	3,4 mL
SDS 10 %	60 μL	50 μL
APS	30 μL	25 μL
TEMED	4 μL	4 μL

Figure 33 : Composition des gels de séparation et de concentration des gels SDS-PAGE.

Les protéines vont ensuite migrer lors du passage d'un courant électrique de 200 V et 35 mA pendant environ 60 minutes. La masse apparente des protéines est évaluée grâce au calibrage du gel par des protéines de poids moléculaire connu. Les bandes correspondant aux protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,25

%, méthanol 45 %, acide acétique 10 %, glycérol 10 %) puis décoloration dans une solution méthanol 30 %, acide acétique 10 %, glycérol 5 %.

3. Dosage de H_2O_2 par la méthode HRP/LCV (HorseRadish Peroxidase/ Leuco Crystal Violet)

Le dosage de H_2O_2 est réalisé selon la méthode de la peroxydase de raifort et de Leuco Crystal Violet (Mottola et coll, 1970). En présence de H_2O_2 , la peroxydase de raifort (HRP), dans un tampon acétate à pH 4.5, catalyse l'oxydation de LCV en CV^+ . Le CV^+ présente une bande d'absorbance à 591 nm ($\epsilon = 80000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène présent dans le milieu.

Une gamme étalon entre 0 et 20 μM de H_2O_2 est réalisé. Le LCV (50 mg) est dissout dans 0.5 mL d'HCl à 37 %, puis la solution est ajusté à 100 mL avec de l'eau. Le tampon acétate est obtenu en mélangeant un volume de 2 M d'acétate de sodium à un volume de 2 M d'acide acétique, puis en ajustant le pH de la solution à 4.5 avec l'acide acétique glacial. Une solution de HRP Type VI-A (Sigma) à 0.18 mg/mL dans de l'eau est préparée. Pour le dosage, dans un volume final de 400 μL , sont ajoutés dans l'ordre, de l'eau (q.s.p 400 μL), 40 μL de la solution de LCV, 160 μL de tampon acétate, 20 μL de HRP et de 0 à 180 μL de la solution à doser, 20 s avant de faire le spectre de la solution entre 400 et 700 nm. Un blanc est réalisé de la même manière sans ajout d' H_2O_2 . L'absorbance du blanc à 591 nm est soustraite aux valeurs des absorbances à 591 nm des échantillons à doser.

4. Mesures d'activité enzymatique

1 Test d'activité NADPH-flavodoxine-oxdoréductase (Fpr)

L'activité de la NADPH-flavodoxine-oxdoréductase de *E. coli* a été testée par son activité de réduction du cytochrome c en présence de NADPH (McIver, 1998). La réaction est réalisée en aérobiose, à 25 °C, dans 1 mL de tampon Tris/HCl 10 mM à pH 7,6, contenant 160 μM de cytochrome c oxydé et 80 μM de NADPH. La réaction est initiée par l'ajout de Fpr. La réduction du cytochrome est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 550 nm ($\epsilon = 22,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Une unité enzymatique correspond à la réduction d'une nmole de cytochrome par minute.

2 Test d'activité flavine réductase (Fre)

L'activité de la flavine réductase de *E. coli* a été testée par son activité de réduction de la riboflavine en présence de NADPH (Fieschi et coll, 1995). La réaction est réalisée en aérobiose, à 25 °C, dans 1 mL de tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7.6, contenant 10 µM de riboflavine et 200 µM de NADPH. La réaction est initiée par l'ajout de Fre. L'oxydation du NADPH est suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Une unité enzymatique correspond à l'oxydation d'une nmole de NADPH par minute.

5. Dosage de O₂ par électrode de Clark

L'oxymètre numérique modèle 10 (Fisher) est composé d'une cuve réactionnelle fermée disposant d'une agitation magnétique. Le système de mesure (électrode de Clark Rank Brothers) est une sonde composée d'une cathode en platine polarisée à -0,6 Volts et d'une anode en argent, immergées dans une solution de KCl à demi saturée et isolée de la cuve par une membrane de téflon laissant diffuser l'oxygène. Dans ces conditions, la variation de courant induite par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. Ces variations de courant sont mesurées et enregistrées.

Les mesures de consommation d'oxygène sont réalisées dans 1 mL de tampon dégazé. La SOR est ajouté à l'aide d'une seringue Hamilton. Une fois la solution équilibrée, la solution de H₂O₂ est ajoutée. La quantité d'O₂ formée est déterminée par la variation de courant enregistré durant la mesure.

C. Etudes d'oxydation et de réduction de la SOR

1. Réduction des centres à fer de la SOR

La réduction des sites métalliques de la SOR par divers réducteurs chimiques ou enzymatiques est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible.

Les différents réducteurs utilisés sont :

- pour le Centre I : la NADPH-flavodoxine-oxydoréductase (Fpr), la flavine réductase (Fre) et le dithionite.

- pour le Centre II : l'ascorbate de sodium, le dithionite, la NADPH-flavodoxine-oxydoréductase (Fpr) et la flavine réductase (Fre).

2. Oxydation des centres à fer de la SOR

L'oxydation des sites métalliques par divers oxydants chimiques ou enzymatiques est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible.

Le Centre I de la SOR de *Desulfoarculus baarsii* est 100% sous forme oxydée après purification ($E'^{\circ} = + 160$ mV/ENH à pH 7.6 (Nivière et coll, 2004)).

Le site actif (Centre II) de la SOR de *D. baarsii* après purification est sous forme réduite, celui de la SOR de *T. pallidum* est ≤ 20 % oxydé. Le site actif de la SOR ne peut être oxydé que par des oxydants de haut potentiel ($E'^{\circ} = + 370$ mV/ENH à pH 7.6). Le plus utilisé est le K_2IrCl_6 (Iridium IV). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut également partiellement oxyder la SOR. D'autres oxydants peuvent former un adduit sur le site actif au cours de l'oxydation comme le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (Clay et coll, 2002; Auchère et coll, 2003), l'acide péracétique et le peroxyde d'hydrogène en excès (Mathé et coll, 2002).

L'oxydation du site actif de la SOR se fait aussi en présence de son substrat naturel, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Le radical superoxyde peut être généré de 3 façons différentes :

♦ *Par une source enzymatique telle que le système de la Xanthine/Xanthine Oxydase.* En présence de xanthine et d'oxygène, la xanthine oxydase forme des radicaux $O_2^{\bullet -}$ et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui peut être éliminé par l'ajout de catalase. La vitesse d'oxydation du site actif de la SOR est alors proportionnelle à la quantité de xanthine oxydase présente dans le milieu réactionnel.

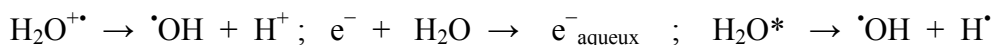
♦ *Par une source chimique ponctuelle :* le superoxyde de potassium KO_2 est soluble et stable dans le DMSO anhydre en présence d'éther couronne 18-Crown-6.

♦ *Par radiolyse de l'eau.* Elle permet de générer une quantité définie de radical superoxyde, permettant l'étude du mécanisme catalytique de la SOR avec son substrat dans des temps de réaction très courts (Favaudon et coll, 1990).

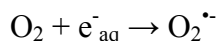
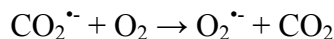
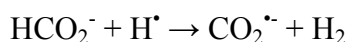
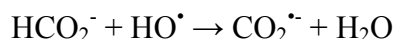
Lorsqu'on soumet une solution aqueuse à l'action d'un rayonnement ionisant, l'eau subit un processus de radiolyse. Le bombardement de la solution aqueuse par les électrons provoque un effet Compton : l'énergie des électrons accélérés ($h\nu$) est absorbée par les molécules d' H_2O et forme les espèces suivantes :



Ces espèces premièrement formées évoluent alors en moins de 1 picoseconde vers les espèces radicalaires suivantes :



Ces espèces radicalaires H^* , $\cdot\text{OH}$ et $\text{e}^-_{\text{aqueux}}$ réagissent, elles-mêmes très rapidement avec le soluté présent dans la solution aqueuse qui sert de capteur de radicaux. Cette méthode par l'emploi de capteurs appropriés permet une sélectivité pour la production d'espèces désirées. L'ajout d'ions formiates dans une solution saturée en oxygène permet d'obtenir spécifiquement des anions $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Bielski et coll, 1985).



Pour une solution saturée en oxygène et contenant 10 à 100 mM de formiate de sodium, la radiolyse de l'eau aboutit à la formation de radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ (rendement radiolytique : $6.2 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$) et de H_2O_2 (rendement radiolytique : $0.7 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$) (Daniels et Wigg, 1966) en moins de 1 μs .

L'appareil de radiolyse pulsée de l'Institut Curie d'Orsay est composé d'une source de rayonnement ionisant provenant d'un accélérateur linéaire produisant des électrons, d'un oscilloscope digital pour enregistrer les données aux différentes longueurs d'ondes, d'un porte échantillon pouvant contenir des cuvettes de 2 cm de trajet optique spécifiques pour la radiolyse pulsée. Les réactions sont suivies à 20 °C dans une région spectrale allant de 340 nm à 750 nm. Les mesures sont enregistrées tous les 5 à 10 nm, à différentes échelles de temps pour pouvoir étudier les différentes constantes de vitesse de la réaction. Les traces cinétiques obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Kaleidagraph. Les espèces transitoires sont alors caractérisées par leur spectre d'absorption et les constantes de vitesse des réactions mises en jeu peuvent être déterminées.

Le radical superoxyde est généré après irradiation de la solution protéique (50-200 μM) et saturé en oxygène. La solution contient également 10 à 100 mM de formiate de sodium et 2 mM de tampon à différents pH.

Le laboratoire Art Nuclear au CEA de Grenoble possède une source de cobalt-60 émettant $4 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ qui permet de réaliser des expériences de radiolyse continue. La solution

de SOR contient 2 mM de tampon dont le pH varie en fonction de l'expérience, 10 mM formiate de sodium et est saturée en O_2 . La durée de l'irradiation, à température ambiante, est de 10 min (40 Gy) et 23 μM de superoxyde sont ainsi produit. La radiolyse de l'eau conduit également à la formation de H_2O_2 , appelé H_2O_2 radiolytique, la dose d'irradiation utilisée dans nos expériences (40 Gy) conduit à la formation de 2.6 μM de H_2O_2 radiolytique.

IV. Techniques Spectroscopiques

1. Spectrophotométrie UV-visible

L'absorption d'un photon peut permettre à une molécule ou un atome de passer de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 , par passage d'un électron d'une orbitale à une autre. L'énergie d'un photon absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donnée par la relation $e = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon ($\nu = 1/\lambda$ avec λ correspondant à la longueur d'onde). En solution, seules les transitions électroniques de faible énergie sont observables, c'est-à-dire les bandes d'absorption dans l'ultraviolet proche et dans le visible. Chaque bande d'absorption est caractérisée par la longueur d'onde du maximum d'absorption, λ_{max} , et par son intensité, donnée par la valeur du coefficient d'extinction molaire (ϵ) à la longueur d'onde considérée. Ces grandeurs sont reliées à la concentration du soluté en solution par la loi de Beer-Lambert $A(\lambda) = \epsilon(\lambda).l.[C]$ où A est l'absorption, l la longueur du trajet optique et $[C]$ la concentration.

Les molécules biologiques qui absorbent sont celles qui possèdent des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques et celles qui contiennent un métal de transition. Ainsi, le pic d'absorption à 280 nm observé pour les solutions protéiques correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. Dans le cas des protéines contenant un métal de transition, il existe plusieurs types de bandes d'absorption.

♦ *Les bandes de transition entre orbitales* : certaines sont permises ($s \leftrightarrow p$, $p \leftrightarrow d$ et $d \leftrightarrow f$) d'autres sont interdites ($s \leftrightarrow d$, $p \leftrightarrow f$, $s \leftrightarrow s$, $p \leftrightarrow p$). Dans les complexes de métaux de transition, il est possible d'observer des bandes de transition $d \leftrightarrow d$ dans le visible. Cependant ces bandes sont en général de faibles intensités.

♦ *Les bandes de transfert de charge* : ce sont en général des bandes assez intenses. Au cours de l'excitation, l'électron passe d'un atome à l'autre. On peut distinguer deux catégories de transition de transfert de charges :

- LMCT ou bande de transfert de charge du ligand vers le métal. Un électron du ligand est transféré à une orbitale métallique.
- MLCT ou bande de transfert de charge du métal vers le ligand. Un électron métallique est transféré à une orbitale localisée sur le ligand.

Les transferts de charge ligand→métal (LMCT) sont en général plus faciles, donc de plus faible énergie (grand λ), puisque la charge formelle sur l'ion métallique augmente. Inversement, les transferts de charge métal→ligand (MLCT) sont plus difficiles, donc de plus haute énergie (faible λ).

Les spectres d'absorption réalisés à température ambiante ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Les études en aérobiose ont été réalisées avec un spectrophotomètre Cary1 Bio (Varian), et les spectres en conditions anaérobies ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Uvikon XL (Bio-Tek instruments) relié par des fibres optiques à la cuve placée à l'intérieur d'une boîte à gants sous atmosphère d'azote ($[O_2] < 5$ ppm).

Les spectres d'absorption réalisés à 100 K ont été réalisés avec le microspectrophotomètre du laboratoire Cryobench de l'ESRF en collaboration avec Dominique Bourgeois (IBS-ESRF Grenoble).

2. Spectroscopie InfraRouge

La Spectroscopie Infrarouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par la molécule analysée. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans la molécule. Elle aide, d'une part, à l'identification de la nature des ligands impliqués dans la chélation du métal et d'autre part, à l'identification des changements structuraux intervenant au niveau de sites d'oxydoréduction.

Les spectres sont enregistrés avec un spectrophotomètre Brucker Vector 22. Une goutte de protéine de 7 μ L à 4 mM est déposée entre deux lames de fluorure de calcium

séparées par des espaceurs en film plastique. Le spectre du solvant est soustrait du spectre final (Berthomieu et coll, 2002).

3. Spectroscopie de résonance Raman

Cette technique est puissante et fiable pour l'obtention d'informations détaillées sur la structure des complexes métalliques dans les systèmes biologiques (notamment le site actif des métalloprotéines). Du fait qu'il s'agit d'une technique vibrationnelle, elle permet d'obtenir un degré de résolution élevé pour les informations structurales sub-moléculaire. La spectroscopie Raman de résonance est un cas particulier de la spectroscopie Raman en général. Elle repose sur le phénomène de résonance qui se produit lorsque la longueur d'onde d'excitation Raman correspond ou approche d'une transition électronique permise (visualisé sur le spectre d'absorption UV-visible) de la molécule d'intérêt. Il y a alors un effet Raman de résonance qui permet une amplification de l'effet Raman. Ainsi, le spectre vibrationnel de ce chromophore va être exalté spécifiquement ce qui permet de minimiser les interférences des autres composés, qu'ils proviennent soit de la protéine ou du solvant par exemple. Cette spectroscopie est ainsi appropriée à l'étude vibrationnelle de solutions diluées (échantillons biologiques).

Les études de spectroscopie Raman ont été réalisées en collaboration avec Philippe Carpentier (IBS de Grenoble) au sein du laboratoire Cryobench de l'ERSF de Grenoble. Les spectres de résonance Raman ont été réalisés par un Microspectromètre Raman (Renishaw InVia). Les expériences ont été conduites à une température de 100 K, avec une onde incidente de longueur d'onde 633 nm provenant d'un laser NEC d'une puissance de 10 mW. Le spectrophotomètre a été adapté pour être utilisé sur le goniomètre du laboratoire Cryobench. La soustraction de la ligne de base et le traitement des données sont réalisés avec le programme Wire.

4. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une méthode qui ne peut détecter que les molécules ou atomes dans un état paramagnétique, c'est-à-dire dans lesquels il existe un ou plusieurs électrons non appariés (Palmer, 2000). Cette méthode peut donc s'appliquer à l'étude des radicaux libres et des ions métalliques dans les métalloprotéines. La RPE permet d'obtenir des informations variées sur la géométrie de coordination du système

paramagnétique étudié. Elle permet d'obtenir des informations sur le type de centre métallique étudié, comme son état de spin ainsi que son degré d'oxydation.

Détection par RPE d'un radical photoproduit:

Les mesures ont été effectuées sur des échantillons de 200 μL de SOR à une concentration de 150 μM dans 50 mM Tris/HCl pH 8.5. Les spectres RPE ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker ESP 300 E à température variable équipé d'un cryostat (Oxford Instruments) qui permet d'atteindre la température de l'hélium liquide. Les expériences sont faites à une fréquence de 9.65 GHz, avec une puissance de 10 mW et d'amplitude de 5 G. Les spectres sont enregistrés à 4 K et 0 40 K.

Détection par RPE de radicaux HO^\bullet :

Les essais sont réalisés dans un tube eppendorf, à température ambiante. Le mélange réactionnel est injecté dans un capillaire car l'onde est absorbée par l'eau dans nos conditions, et déposé dans la cavité de l'appareil RPE. Les spectres sont enregistrés à température ambiante. Un spectromètre Bruker EMX est utilisé. Les expériences sont faites à une fréquence de 9.36 GHz, avec une puissance de 10 mW et d'amplitude de 2 G.

Dans tout les cas, on vérifie en augmentant la puissance que le signal n'est pas saturé.

5. Mössbauer

La spectroscopie Mössbauer ou spectroscopie d'absorption γ est l'étude de l'absorption de rayons γ par certains noyaux d'atome. Ce phénomène se produit lorsqu'un photon γ , émis par un noyau émetteur lors de la désexcitation de ce noyau (qui passe donc d'un niveau excité E_e à l'état fondamental E_f) est absorbé par un noyau identique se trouvant dans l'état fondamental. Le noyau absorbant est alors excité au niveau d'énergie E_e . Dans notre cas, la source de rayonnement γ est obtenue par désintégration radioactive de l'isotope $^{57}\text{Co}^*$. Celui-ci se convertit lentement par capture électronique en un état excité noté $^{57}\text{Fe}^*$. Dans un délai de l'ordre de la microseconde, le $^{57}\text{Fe}^*$ revient à l'état fondamental par l'émission d'une radiation électromagnétique de haute fréquence dans la région des énergies γ . Si les noyaux de l'échantillon se trouvent dans un environnement différent de celui de la source, la modification de l'environnement électronique des noyaux produit un effet suffisant sur les niveaux d'énergie nucléaires pour que l'absorption n'ait plus lieu. Pour rétablir la résonance,

la fréquence des rayons γ doit être modifiée. Cette variation est obtenue en déplaçant la source à une vitesse relative v par rapport à l'absorbant. Ceci conduit à un balayage approprié du spectre de fréquences γ susceptibles d'être captées par l'échantillon absorbeur. C'est le principe de l'effet Doppler. En spectroscopie Mössbauer, les énergies sont donc exprimées en unités de vitesse et les vitesses requises sont généralement de l'ordre du mm/s. Ainsi, les spectres Mössbauer indiquent la transmission relative des rayons γ ayant traversé l'échantillon en fonction de la vitesse relative de la source par rapport à l'absorbant.

Une purification du mutant E47A de la SOR de *D. baarsii* identique à celle décrite dans le matériel et méthode est réalisée mais en présence de 50 μM de $^{57}\text{FeCl}_3$. La solution protéique doit être assez concentrée (900 μM de SOR) dans un volume de 400 μL . Elle est alors congelée dans une cellule Mössbauer adaptée. Ces études Mössbauer sont réalisées au laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux à Grenoble dans l'équipe PMB dirigée par Jean-Marc Latour.

6. Spectrométrie de Masse

Spectroscopie de masse à temps de vol avec source electrospray :

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse physico-chimique permettant l'étude des ions ou des molécules chargées. Par cette technique nous pouvons déterminer la masse de la protéine et caractériser d'éventuelles modifications de masse.

Les données sont obtenues à partir d'un spectromètre de masse à temps de vol avec source electrospray (LC/MSD TOF Agilent) couplé à un HPLC (Agilent 1100 series). La solution de SOR est diluée à 2 nM dans 0.1 % d'acide formique. La mesure est effectuée sur 100 μL de cette dilution. L'échantillon est préconcentré et dessalé sur une colonne peptide MacroTrap (Michrom Bioresources) avec 0.03 % d'acide formique dans de l'eau puis élué avec 70 % de tampon B (95% acétonitrile, 5% eau, 0.03 % d'acide formique).

La spectrométrie des protéines SOR a été réalisée par Izabel Bérard du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéine à Institut de Biologie Structural de Grenoble.

Spectrométrie de masse (ESI-MS) :

Les spectres de masse du méthyl phényl sulfoxyde marqué ^{18}O ou non, sont réalisés au SCIB/INAC/CEA-Grenoble en collaboration avec Colette Lebrun sur un Thermoquest

Finnigan LCQ à trappe d'ions en utilisant la technique d'ionisation électrospray (ESI-MS) en mode positif (ESI+).

7. Fluorimétrie

Par son noyau indol, le tryptophane présente une émission de fluorescence dont les caractéristiques, longueur d'onde et intensité, peuvent être largement modulées par l'environnement de ce noyau. Dès lors, tout événement qui modifie l'exposition d'un tryptophane, tel qu'un changement de conformation ou la liaison d'un ligand, a pour effet de modifier sa fluorescence. Un tryptophane (Trp 122) est proche du site actif de la SOR de *D. baarsii* (Kurtz, 2006). La fluorescence intrinsèque constitue donc un outil de choix pour mesurer l'interaction SOR-ferrocyanure. En effet, la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence (λ_{max}) du tryptophane 122, située aux alentours de 335 nm, perd de l'intensité lorsque le ferrocyanure se fixe au site actif.

La longueur d'excitation est de 295 nm et les spectres de fluorescence sont enregistrés entre 300 et 400 nm. L'excitation à 295 nm permet d'étudier sélectivement la fluorescence des tryptophanes de la protéine. La variation de la fluorescence émise par la SOR à 335 nm est étudiée sur 3 mL d'une solution contenant 2 μM de SOR et dans laquelle sont ajoutés progressivement de 0 à 80 μM de ferrocyanure dans 10 mM tampon Tris/HCl à pH 7.6.

Les expériences de fluorescence du tryptophane sont réalisées sur un fluorimètre Jasco FP-6500 dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique. Les spectres sont la moyenne de 3 accumulations. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 295 nm. Les bandes passantes sont de 5 nm en excitation et en émission. La vitesse de balayage est de 100 nm.min⁻¹ et le temps de réponse est de 2 s.

8. Test de sulfoxydation du thioanisole

Réaction d'oxydation du thioanisole

100 μM de SOR sont mis en réaction avec 100 μM de H_2O_2 dans 100 μL , en présence de 3 mM thioanisole, 0.4 M d'éthanol, 10 mM Tris/HCl pH 8.5. L'éthanol est présent dans le milieu pour augmenter la solubilité du thioanisole dans l'eau. L'ajout de thioanisole induit donc l'ajout d'éthanol. La réaction est stoppée 10 min après l'ajout de H_2O_2 . Le sulfoxyde formé est récupéré par 3 extractions de 200 μL de dichlorométhane. La phase organique est

recupérée à chaque extraction. 10 nmol de benzophénone sont alors ajoutées comme étalon interne. La phase organique est concentrée sous évaporateur rotatif. La quantité de méthyl phényl sulfoxyde formée est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (GC).

Suivi de l'oxydation par chromatographie en phase gazeuse (GC)

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les différents composés d'un mélange. Cela permet de faire une étude quantitative en utilisant un standard interne. Une fraction du mélange réactionnel est prélevée et 1 μ L est injecté en GC pour l'analyse et la quantification des produits d'oxydation. La nature des produits d'oxydation a été déterminée en spectroscopie de masse et par comparaison des temps de rétention sur GC avec des échantillons de produits purs.

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur un Perkin–Elmer Autosystem muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et connecté à un intégrateur PE NELSON 1022. Le programme de température commence à 100 °C pendant 4 min puis monte de 25 °C.min⁻¹ pour atteindre 220 °C, cette température est maintenue pendant 4 min. La température de l'injecteur et du détecteur est de 250 °C et 280 °C, respectivement.

La colonne utilisée est une colonne capillaire de modèle Optima 17, phase inverse de chez Machery-Nagel. Ses caractéristiques géométriques sont 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 μ m de phase stationnaire (polyméthylphénylsiloxane). Le débit d'azote porteur est de 2 mL.min⁻¹. Les temps de rétention des différents constituants du mélange réactionnel sont présentés ci-dessous. La benzophénone est utilisée comme référence interne, le thioanisole comme substrat.

Produit et référence interne : - Thioanisole 6.8 min

- Sulfoxyde 9.5 min

- Sulfone 10.1 min

- Benzophénone 11.6 min

Le facteur de réponse est calculé dans les conditions de l'expérience. Dans 100 μ L d'une solution de 10 mM Tris/HCl pH 8.5, sont ajoutées différentes quantités de méthyl phényl sulfoxyde (5, 10, 15 et 20 nmol). Le sulfoxyde est récupéré par 3 extractions de 200 μ L de dichlorométhane. La phase organique est récupérée à chaque extraction. 10 nmol d'étalon interne (benzophénone) sont ajoutées. La phase organique est concentrée sous évaporateur rotatif. La quantité de méthyl phényl sulfoxyde formée est mesurée par chromatographie en

phase gazeuse (GC). Le facteur de réponse (FR) est la pente de la courbe $n(\text{sulfox})/n(\text{ref}) = \text{FR} \times S(\text{sulfox})/S(\text{ref})$, FR est déterminé à 2.44.

Détection énantiosélective par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Pour séparer et détecter les deux énantiomères de méthyl phényl sulfoxyde formés, la colonne utilisée est une colonne capillaire de modèle lipodex E de chez Machery-Nagel. Le programme de température utilisé commence à 120 °C pendant 15 min puis monte de 3 °C.min⁻¹ pour atteindre 140 °C, cette température est maintenue pendant 20 min. La température de l'injecteur et du détecteur est de 250 °C et 280 °C, respectivement.

Chapitre III :
Mécanisme de transfert d'électrons au
site actif de la SOR

I. Introduction

Les SORs de classe 1 possèdent en plus du site actif un autre centre à fer de type rubrédoxine avec un potentiel plus bas (le potentiel redox du Centre I, à pH 7.6, est de 160 mV/ENH alors que celui du Centre II est de 370 mV/ENH chez la SOR de *D. baarsii* (Nivière et coll, 2004)). Cela laisse donc présumer que le Centre I joue un rôle dans le transfert d'électrons vers le site actif. Cependant, la distance entre les fers de ces deux centres, de 22 Å, est trop grande pour imaginer un transfert d'électrons intramoléculaire entre ces deux centres (Coelho et coll, 1997 ; Kurtz et Coulter, 2002). D'autre part, aucune différence majeure n'a été remarquée entre l'activité des SORs à deux centres et celles à un centre. Ces deux types de SOR sont présents chez *A. fulgidus* (Rodrigues et coll, 2007). La présence de ces deux SORs de classes différentes dans un même organisme semble redondante. Elle pourrait aussi indiquer la possibilité que le Centre I possède une autre fonction, inconnue à ce jour. Malgré le fait que le rôle du Centre I ne semble pas être en relation avec l'activité superoxyde réductase de la SOR, ce centre semble avoir été conservé au cours de l'évolution (Pereira et coll, 2007). Plusieurs fonctions alternatives peuvent être envisagées pour le Centre I (Emerson et coll, 2003). Tout d'abord, le manque apparent d'interaction avec le site actif ne privilégie pas l'hypothèse d'une fonction de signalisation redox intramoléculaire. Ensuite, un rôle purement structural semble peu probable étant donné la ressemblance de structure et d'activité entre la SOR sauvage de *D. vulgaris* Hildenborough et son mutant C13S, qui ne possède plus de Centre I (Emerson et coll, 2003). Par ailleurs, le domaine N-terminal des SORs de classe 1 qui lie le Centre I présente une forte homologie avec la desulforédoxine, une petite protéine contenant un site $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ et qui est connue pour être impliquée dans des transferts d'électrons (Moura et coll, 1999). La possibilité d'un rôle de relais électronique pour le Centre I avec un partenaire physiologique inconnu à ce jour ne peut pas être exclue.

Pour son activité catalytique, la SOR nécessite des partenaires physiologiques. La présence de donneurs d'électrons est nécessaire pour régénérer le site ferrique et finaliser le cycle catalytique de l'enzyme. *In vitro*, la SOR peut accepter les électrons d'une large gamme de réducteurs cellulaires. Cela concerne des protéines de transfert d'électrons présentes dans les bactéries qui naturellement expriment la SOR, telle la rubrédoxine, la desulforédoxine, ou les cytochromes (Emerson et coll, 2003 ; Auchère et coll, 2004), mais aussi des enzymes non présentes chez ces bactéries, telle la NADPH ferrédoxine réductase d'épinard (Emerson et coll, 2001) (Figure 34).

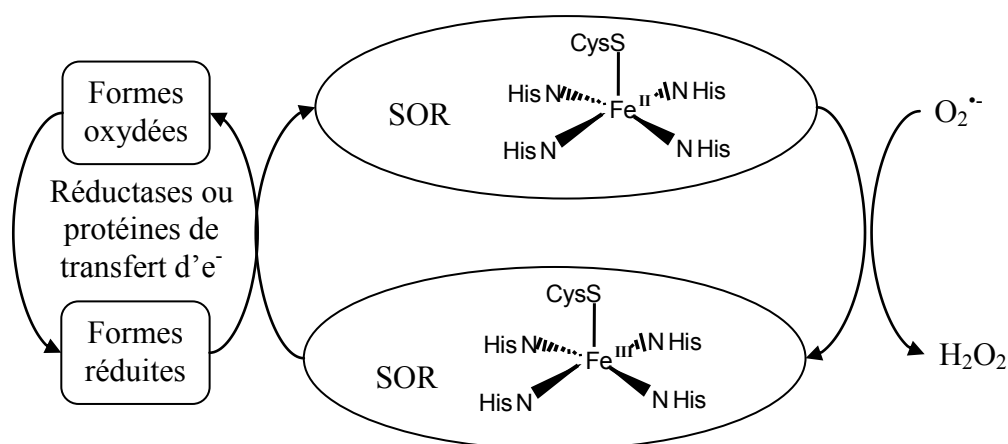


Figure 34 : Cycle catalytique de la SOR.

La rubrédoxine a été montrée comme étant un donneur d'électrons efficace de la SOR chez *D. vulgaris* Hildenborough (Coulter et Kurtz, 2001), *A. fulgidus* (Auchère et coll, 2004), *P. furiosus* (Grunden et coll, 2005) et *T. pallidum* (Rodrigues et coll, 2005). La rubrédoxine est une protéine fer-soufre isolée de nombreuses bactéries aérobies ou anaérobies. Cette petite protéine (45 à 54 acides aminés) possède un centre à fer relié à quatre cystéines dans une géométrie tétraédrique, similaire au Centre I de la SOR. Dans les bactéries anaérobies, les gènes codants pour la rubrédoxine sont souvent dans le même opéron que celui codant pour la SOR. Bien que la rubrédoxine soit la principale candidate comme donneur d'électrons à la SOR, il est possible que d'autres protéines de transfert d'électrons remplissent aussi ce rôle *in vivo*.

Coulter et coll. ont démontré que chez *D. vulgaris* la rubrédoxine catalyse la réduction à la fois du site actif (Centre II de la SOR) et du centre type rubrédoxine (Centre I). Cependant la réduction du Centre II est 4 fois moins rapide que celle du Centre I (Coulter et Kurtz, 2001, Emerson et coll, 2003).

Bien que *E. coli* ne possède pas de gène codant pour la SOR, il a été montré que l'expression hétérologue de la SOR pouvait totalement remplacer les activités SODs dans les mutants *sodA⁻sodB⁻* de *E. coli* (Pianzzola et coll, 1996). Ces données suggèrent que la SOR peut fonctionner de façon catalytique dans *E. coli* et donc qu'il existe des protéines capables de lui donner des électrons. Dans ce chapitre, nous avons étudié les propriétés de deux réductases de *E. coli* quant à leur capacité de donner des électrons à la SOR : la flavodoxine réductase (Fpr) et la flavine réductase (Fre). Nous avons regardé la contribution du Centre I dans ces processus de réduction et montré qu'il joue un rôle de relais électronique interprotéique.

II. Rôle du Centre I dans les transferts d'électrons

A. Réduction par deux systèmes enzymatiques de *E. coli*

Chez *E. coli*, la flavodoxine réductase et la flavodoxine sont les deux composantes flavoprotéines d'une courte chaîne de transfert d'électrons qui va du NADPH à divers systèmes enzymatiques, comme la biotine synthase (Sanyal et coll, 1994), la méthionine synthase cobalamine-dépendante (Fujii et Huennekens, 1974), mais également, en conditions anaérobies, la pyruvate formate lyase (Blaschkowski et coll, 1982) et la ribonucléotide réductase de classe III (Reichard, 1993). Le système flavodoxine réductase/flavodoxine est à présent considéré comme le système réducteur de *E. coli*, capable d'assurer le fonctionnement des cytochromes P-450 eucaryotes exprimés chez *E. coli* de façon hétérologue (Jenkins et Waterman, 1994). La flavodoxine réductase (Fpr) de *E. coli*, est une protéine de 27 620 Da, de structure monomérique et qui contient un cofacteur FAD. Le potentiel redox du couple $\text{FADH}^+/\text{FADH}_2$ est de - 268 mV/ENH, celui du couple FAD/FADH^+ est de - 308 mV/ENH (McIver et coll, 1998).

La flavine réductase (Fre) de *E. coli* catalyse la réduction des flavines libres, riboflavine, FAD et FMN, en présence de NADPH (Fieschi et coll, 1995 ; Nivière et coll, 1999). C'est une protéine de 26 000 Da, qui ne contient pas de cofacteur métallique ou flavinique.

1. Réduction de la SOR par la Fpr

Nous avons étudié la réduction de la SOR par la NADPH flavodoxine réductase (Fpr) de *E. coli* (Figure 35). La flavodoxine réductase est capable de réduire le Centre I et le Centre II de la SOR de *D. baarsii*. Il est possible de suivre en UV-visible l'oxydation de NADPH spécifiquement associé à la réduction de la SOR ou de suivre directement la réduction des centres à fer de l'enzyme. Le Centre II oxydé présente une bande d'absorption caractéristique à 644 nm, alors que le Centre I oxydé présente lui une bande à 503 nm. En suivant la variation d'absorbance à 644 nm, nous suivons majoritairement la réduction du Centre II, la contribution du Centre I oxydé à cette longueur d'onde est faible. De même, à 503 nm nous

suivons majoritairement la réduction du Centre I, la contribution du Centre II oxydé est faible à cette longueur d'onde.

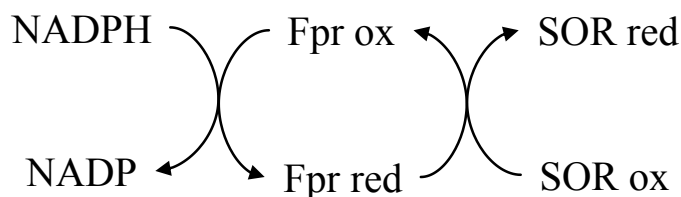


Figure 35 : Schéma de la réduction de la SOR par la NADPH flavodoxine réductase.

La présence d'oxygène peut biaiser nos cinétiques de réduction du Centre I. En effet le Centre I réduit s'oxyde à l'air. Nous travaillons donc en anaérobiose sous atmosphère d'azote.

En fin de purification, la SOR de *D. baarsii* est semi oxydée, le Centre I est sous forme Fe^{3+} alors que le site actif est sous forme Fe^{2+} . Pour étudier la réduction des deux centres de la protéine, le site actif est oxydé au préalable de manière chimique, par ajout légèrement sur-stœchiométrique de chlorure d'iridium. L'excès d'iridium est alors éliminé par lavage de la protéine avec un centricon.

En anaérobiose, la variation d'absorbance est suivie à 503 et 644 nm en fonction du temps, d'une solution contenant 110 μM de SOR $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, 0.7 μg de Fpr et de 800 μM de NADPH (Figure 36).

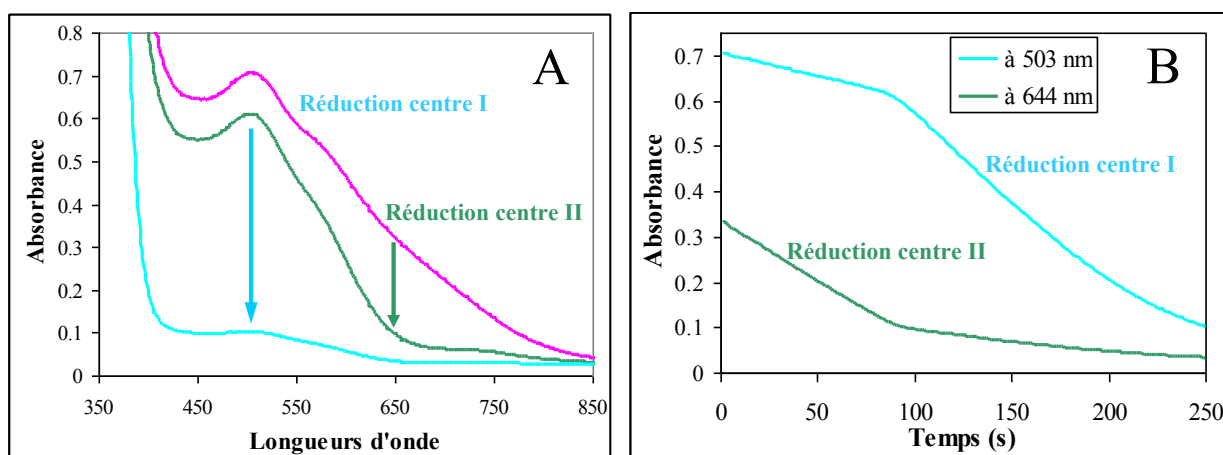


Figure 36 : (A) Spectres UV-visible des différents états d'oxydation de la SOR de *D. baarsii* (140 μM) dans 25 mM Tris/HCl, pH 7.6. En rose le spectre de la SOR totalement oxydée ; en vert le spectre de la SOR semi réduite ; en bleu le spectre de la SOR totalement réduite. (B) Evolution de l'absorbance à 503 nm (λ_{max} du Centre I oxydé $\epsilon_{503 \text{ nm}} = 4.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à 644 nm (λ_{max} du Centre II oxydé $\epsilon_{644 \text{ nm}} = 1.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) lors de la réduction de 140 μM de SOR par 0.7 μg de Fpr, en présence de 800 μM de NADPH et 25 mM Tris/HCl, pH 7.6 en anaérobiose, à 25°C. Le volume de la cuve est de 200 μL .

En absence de Fpr, le NADPH ne réduit ni le Centre I ni le Centre II de la SOR. En présence de Fpr et de NADPH, nous observons une réduction en deux phases. Tout d'abord,

l'absorbance à 644 nm diminue fortement, ce qui correspond à la réduction du Centre II. L'absorbance à 503 nm diminue aussi légèrement au cours de cette phase, correspondant à la petite contribution du Centre II à cette longueur d'onde. Dans un second temps, nous observons une forte diminution de l'absorbance à 503 nm qui correspond à la réduction du Centre I. De même, nous remarquons que l'absorbance à 644 nm diminue légèrement au cours de cette phase, cette diminution est due à la contribution du Centre II à cette longueur d'onde. Ces cinétiques nous permettent de déterminer les vitesses initiales de réduction des Centres I et II de la SOR. La vitesse de réduction de Centre II de la SOR dans les conditions de la Figure 36 est de 24 200 U/mg de Fpr, celle du Centre I est de 15 500 U/mg de Fpr. Une Unité représente 1 nmole de Centre I ou II réduite par minute.

De manière remarquable, quand nous étudions la réduction de la SOR par la NADPH flavodoxine réductase (Fpr) de *E. coli*, nous observons une réduction successive du Centre II puis du Centre I avec des vitesses de réduction proches. Afin de mieux caractériser ce phénomène, nous avons étudié les paramètres enzymatiques de réduction de la SOR par la Fpr.

Paramètres enzymatiques de réduction de la SOR par Fpr

La réduction de la SOR par la Fpr a été étudiée à différentes concentrations de SOR et les vitesses initiales de réduction ont été déterminées à 503 nm pour la réduction du Centre I et à 644 nm pour la réduction du Centre II. Nous remarquons que, quelque soit la concentration initiale de SOR, la vitesse de réduction du Centre I est identique, que la SOR soit initialement totalement oxydée ou semi oxydée. Les données obtenues dans les deux cas sont donc regroupées. Les cinétiques observées sont de type Michaeliennes. Les valeurs de la constante de Michaelis, K_m , et de la vitesse maximale de réaction, V_m , pour la réduction des Centres I et II ont pu être déterminées (Figure 37).

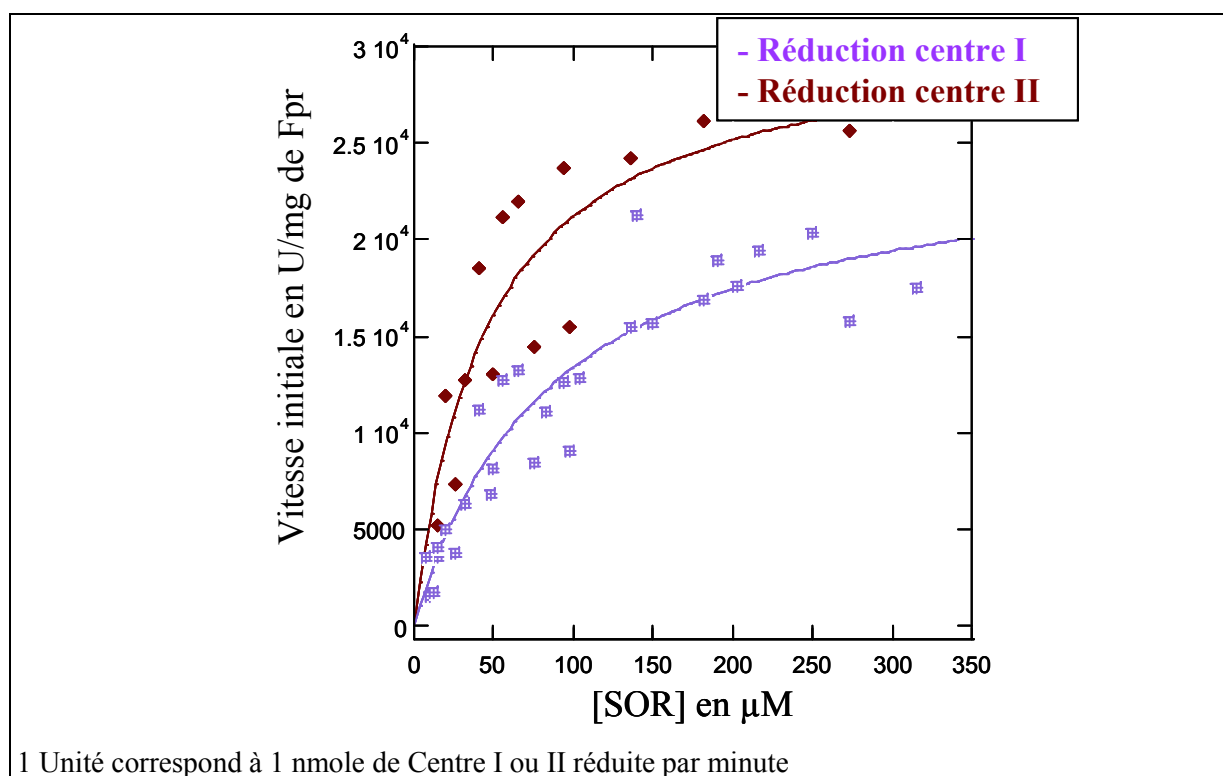


Figure 37 : Dépendance de la vitesse initiale de réduction du Centre I (violet) et du centre II (marron) de la SOR de *D. baarsii* par la Fpr en fonction de la [SOR]. Les vitesses sont mesurées en anaérobiose, à 25°C, par le suivi de l'absorbance à 644 nm pour la réduction du Centre II et à 503 nm pour la réduction du Centre I, en présence de 800 μM de NADPH, de 3.5 mg/L de Fpr et 25 mM Tris/HCl, pH 7.6. Les vitesses initiales en fonction de [SOR] sont modélisables par l'équation $V = (V_{\max} \times [SOR]) / (K_m + [SOR])$ avec pour la réduction du Centre I : $K_m = 81 \pm 20 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 2.511 \pm 0.237 \times 10^4 \text{ U/mg de Fpr}$; pour la réduction du Centre II : $K_m = 46 \pm 16 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 3.096 \pm 0.394 \times 10^4 \text{ U/mg de Fpr}$. Le volume de la cuve est de 200 μL.

La Fpr réduit efficacement les deux centres de la SOR. Le Centre I est réduit avec un K_m de $46.02 \pm 16 \mu\text{M}$ et une V_{\max} de $2.511 \pm 0.237 \times 10^4 \text{ U/mg de Fpr}$. La réduction du Centre II par la Fpr présente elle, un K_m de $81 \pm 20 \mu\text{M}$ et une V_{\max} de $3.096 \pm 0.394 \times 10^4 \text{ U/mg de Fpr}$. Ces deux réductions sont toujours successives, le Centre II est réduit en premier puis le Centre I, avec des vitesses et des efficacités proches. En effet, les calculs des constantes catalytiques (k_{cat}) de ces réactions donnent des valeurs de 14.8 s^{-1} et 18.9 s^{-1} et leur efficacité catalytique (k_{cat} / K_m) est de $1.83 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $4.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la réduction des Centres I et II respectivement.

La vitesse de transfert d'électrons entre la Fpr de *E. coli* et son substrat naturel, la Fld, est de $k_{\text{cat}} = 0.04 \text{ s}^{-1}$ à 30 °C (McIver et coll, 1998). Le K_m de la Fld pour la Fpr a été déterminé à une valeur de $7 \mu\text{M}$ et son efficacité catalytique k_{cat}/K_m est donc de $5.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cela représente une valeur 50 fois inférieure à l'efficacité catalytique de la Fpr pour la réduction de la SOR de *D. baarsii* (Figure 37). Lorsque l'accepteur d'électrons de la Fpr de *E. coli* est une

petite molécule comme le ferricyanure de potassium, les constantes cinétiques observées sont les suivantes : $k_{cat} = 27 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 24 \text{ } \mu\text{M}$, $k_{cat}/K_m = 1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (McIver et coll, 1998). Nous remarquons que ces valeurs sont très proches de celles rapportées ici pour la réduction de la SOR par la Fpr. Ces valeurs correspondent aux constantes de vitesse de réaction de transfert d'électrons rapportées en général pour des systèmes protéine-protéine et qui sont de l'ordre de 10^5 - $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Lin, 1999 ; Aubert et coll, 1998).

Nos données montrent que la Fpr de *E. coli* est capable de réduire très efficacement le Centre II et le Centre I de la SOR. Cependant, et de façon surprenante, elle réduit ces deux centres de manière successive, d'abord le Centre II, puis une fois le Centre II totalement réduit, le Centre I. Afin de regarder si ce phénomène est lié à des propriétés particulières de la réductase utilisée, nous avons étudié la réduction de la SOR avec une autre réductase de *E. coli*, la flavine réductase (Fre).

2. Réduction de la SOR par la Fre

La flavine réductase Fre est une réductase présente chez *E. coli* qui réduit les flavines libres, riboflavines, FMN et FAD, à partir du NAD(P)H. Les flavines réduites sont d'excellents réducteurs à un ou deux électrons. Nous avons regardé si une de ces flavines libres, la FMN, réduite par Fre pourrait réduire la SOR (Figure 38). Nous avons suivi en UV-visible la réduction des centres à fer de l'enzyme. De même que pour la Fpr, en suivant la variation d'absorbance à 644 nm, nous suivons la réduction du Centre II et à 503 nm, nous suivons la réduction du Centre I.

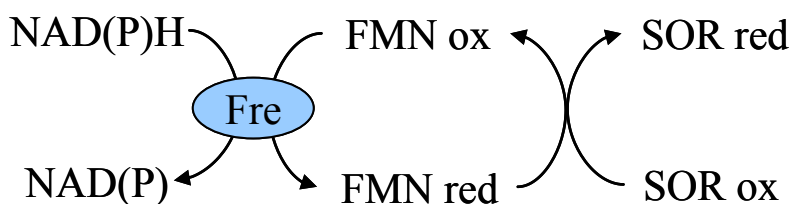


Figure 38 : Schéma de la réduction de la SOR par la NAD(P)H flavine réductase en présence de FMN.

La réduction de la flavine FMN par la Fre a été bien étudiée (Fieschi et coll, 1995). Ces études ont déterminé pour cette réaction une constante K_m de $2.2 \text{ } \mu\text{M}$ et une constante catalytique, k_{cat} de 161 min^{-1} . L'oxydation du NADPH par la Fre a une constante K_m de $30 \text{ } \mu\text{M}$. Nous nous sommes donc placés dans des conditions proches de la vitesse maximale, où les concentrations de FMN et de NADPH sont supérieures à $5 K_m$.

En anaérobiose, la variation d'absorbance est suivie à 503 et 644 nm, lors de la réduction de 110 μM de SOR $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ par 0.22 μg de Fre, en présence de 15 μM de FMN et 400 μM de NADPH (Figure 36).

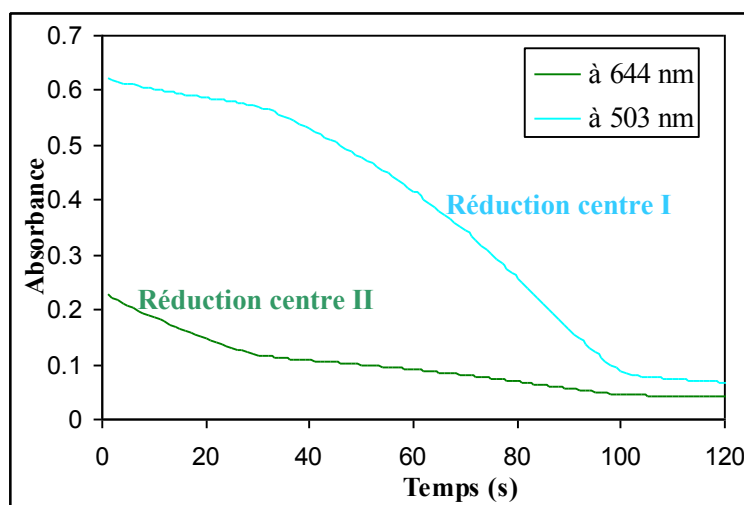


Figure 39 : Evolution de l'absorbance à 503 nm (λ_{max} du Centre I oxydé) et à 644 nm (λ_{max} du Centre II oxydé) lors de la réduction de la SOR de *D. baarsii* (110 μM) dans 25 mM Tris/HCl, pH 7.6 par 0.22 μg de Fre, en présence de 15 μM de FMN et 400 μM de NADPH, en anaérobiose, à 25°C, dans 100 μL .

En absence de Fre, la FMN et le NADPH ne réduisent ni le Centre I, ni le Centre II de la SOR. En présence de Fre, de FMN et de NADPH, une réduction successive des deux centres à fer de la SOR est observée, de la même manière que lors de la réduction de la SOR par Fpr. Le Centre II est réduit en premier, puis le Centre I. Si l'activité spécifique de réduction de la SOR est déterminée dans ces conditions, nous trouvons qu'en présence de FMN, le Centre I est réduit avec une vitesse de 41 000 U/mg de Fre et le Centre II de 69 400 U/mg de Fre (1 Unité correspond à 1 nmole de Centre I ou II réduite par minute).

La Fre est donc capable de réduire très efficacement le Centre II et le Centre I de la SOR. Elle réduit ces deux centres de manière successive, d'abord le Centre II, puis une fois le Centre II totalement réduit, le Centre I avec une vitesse proche, de la même manière que lors de la réduction de la SOR par la Fpr.

Afin de mieux caractériser ce phénomène, nous avons cherché à étudier les paramètres enzymatiques de réduction de la SOR par la Fre.

Paramètres enzymatiques de réduction de la SOR par Fre

Notons que du fait que la Fre utilise la flavine comme substrat et non comme cofacteur, la réduction de la SOR par la Fre en présence de FMN est plus complexe que la

réduction de la SOR par la Fpr. En effet cette réduction correspond à deux réactions successives, la réduction du FMN par Fre, à l'intérieur du site actif de Fre, puis la réduction de la SOR par la FMN réduit, en dehors du site actif de Fre (Figure 38).

Afin d'étudier les paramètres de réduction de la SOR par la FMN (K_m , k_{cat} ...), il faut se placer dans des conditions où la réduction de FMN par la Fre n'est pas limitante. Or, dans la gamme des concentrations de FMN et de SOR expérimentalement étudiables la vitesse de réduction du Centre II mesurée dans nos conditions expérimentales, est de l'ordre de 70 000 U/mg de Fre (Figure 39). Cette valeur correspond à l'activité spécifique de réduction de la FMN par la flavine réductase, avec un transfert de deux électrons du NADPH vers la SOR (Fieschi et coll, 1995). La réaction de réduction de la FMN par la Fre est donc toujours limitante et nous ne pouvons pas ainsi déterminer les paramètres de réduction de la SOR par la Fre en présence de FMN. Les flavines libres réduites semblent transférer très efficacement leurs électrons à la SOR et cette réaction n'est pas limitante par rapport à la réduction des flavines par la Fre dans nos conditions expérimentales.

Les paramètres enzymatiques de réduction de la SOR par la Fre n'ont donc pas pu être déterminés et la réduction séquentielle des Centres I et II par la Fre est plus difficile à étudier que dans le cas de la Fpr.

Cependant, que la SOR soit réduite par l'une ou l'autre des réductases, la réduction des Centres I et II est séquentielle et cela suggère qu'il s'agit là d'une propriété caractéristique de la SOR. Les données sur la Fpr montrent que l'efficacité de ces réductions successives des deux centres à fer est proche, leur valeur de k_{cat}/K_m est égale à $1.83 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $4.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement pour la réduction de Centre I et II (Figure 37). Nous pouvons formuler deux hypothèses qui pourraient justifier la réduction séquentielle de ces deux centres. Première hypothèse, le Centre II peut être réduit préférentiellement car son potentiel redox est supérieur à celui du Centre I. Le potentiel redox du Centre II, à pH 7.6, est de 370 mV/ENH alors que celui du Centre I est de 160 mV/ENH (Nivière et coll, 2004). Le potentiel du couple FAD/FADH[•] de la Fpr est de -308 mV/ENH (McIver et coll, 1998). Selon la théorie de Marcus, plus la différence de potentiel est grande entre deux centres redox, plus la vitesse de transfert d'électrons sera élevée. Cependant les vitesses de transfert d'électrons entre la Fpr et les Centres I et II sont du même ordre de grandeur (Figure 37). Cela indique que le potentiel redox n'est pas déterminant dans ce transfert d'électrons. Seconde hypothèse, la Fpr réduit le Centre II par l'intermédiaire du Centre I, c'est-à-dire que la Fpr réduit uniquement le Centre I qui par la suite et de manière quasi instantanée va réduire le Centre II. Cette hypothèse est

suggérée notamment par les valeurs des K_m de la Fpr pour les Centres I et II qui sont du même ordre de grandeur, avec des environnements autour des Centres I et II complètement différents (Adam et coll, 2004).

Les potentiels redox des deux centres sont compatibles pour imaginer un transfert d'électrons entre le Centre I et le Centre II. Cependant, la distance fer-fer au sein d'une protéine SOR étant trop grande (de l'ordre de 22Å en intra-monomère et de 32Å en inter-monomère) pour imaginer un transfert d'électrons intramoléculaire (Coelho et coll, 1997 ; Kurtz et Coulter, 2002), un transfert d'électrons inter-protéique pourrait être alors envisagé.

B. Echange d'électrons entre les deux centres de la SOR de *D. baarsii*

1. Les échanges d'électrons Centre I-Centre II

Afin de vérifier cette hypothèse d'un transfert d'électrons interprotéique entre le Centre I d'une SOR et le Centre II d'une autre SOR les expériences suivantes sont réalisées. Une solution de SOR totalement réduite $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ (15 nmoles) est mélangée avec une solution de SOR totalement oxydée $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ (15 nmoles) dans des volumes identiques.

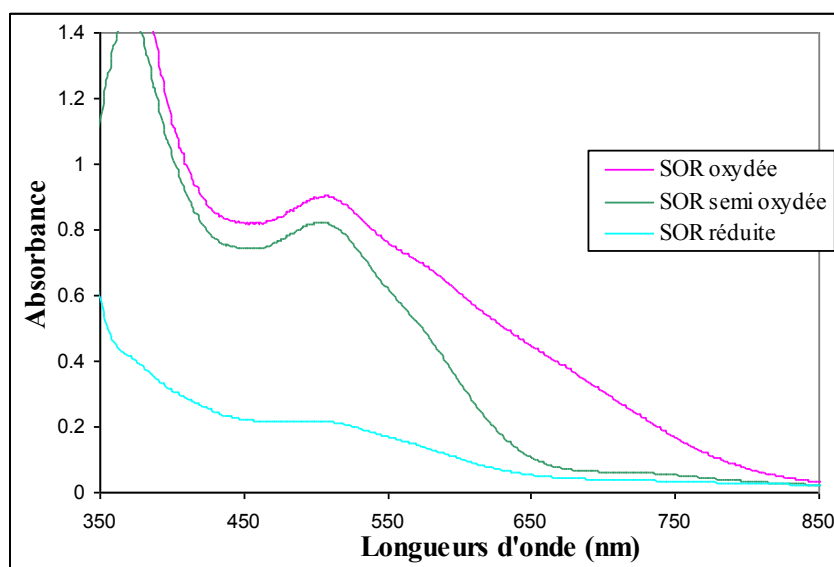
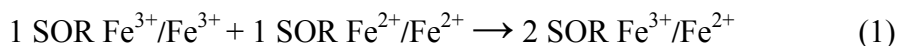


Figure 40 : Spectres UV-visible, en **bleu**, d'une solution de 80 μL contenant 190 μM de SOR $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ (15 nmoles) dans 10 mM Tris/HCl pH 7.6, en **rose**, d'une solution de 80 μL contenant 190 μM de SOR $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ (15 nmoles) dans 10 mM Tris/HCl pH 7.6. Ces deux solutions sont mélangées volume à volume à 25°C en anaérobiose. Immédiatement après, le spectre **vert** est enregistré sur le mélange (160 μL) contenant 190 μM de SOR.

Après mélange, il se forme immédiatement 30 nmoles de SOR semi-réduite (Figure 40). Il y a donc eu transfert d'électrons entre le Centre I et le Centre II comme cela est décrit par l'équation suivante :



Le Centre I est donc un réducteur du Centre II par transfert d'électrons intermoléculaire. Cette réaction est très rapide, elle est instantanée dans nos conditions de mélange (Figure 40).

2. Cinétique rapide sur les échanges d'électrons Centre I-Centre II

Nous avons essayé de déterminer cette vitesse de transfert d'électrons entre la SOR $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ avec la SOR $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ par cinétique rapide stopped-flow afin de voir si elle est compatible avec les vitesses de réduction de la SOR déterminées notamment avec la Fpr.

Nous avons utilisé un appareil de mélange rapide couplé à une détection UV-visible (stopped-flow). Les réactifs sont placés dans deux compartiments différents. Une première seringue contient une solution de 40 μM de SOR $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ oxydée au chlorure d'iridium (puis lavée pour éliminer l'excès d'iridium). La seconde seringue contient une solution de 40 μM de SOR $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ réduite à l'ascorbate. Le stopped-flow est programmé pour mélanger 50 μL de chacune de ces deux solutions. La variation d'absorbance est enregistrée à 644 nm afin de suivre la réduction du Centre II. Le temps mort lié au mélange des réactifs est estimé dans nos conditions expérimentales à 2 ms (données constructeur). La Figure 41 montre la cinétique obtenue, convertie en concentration de Centre II oxydé en fonction du temps

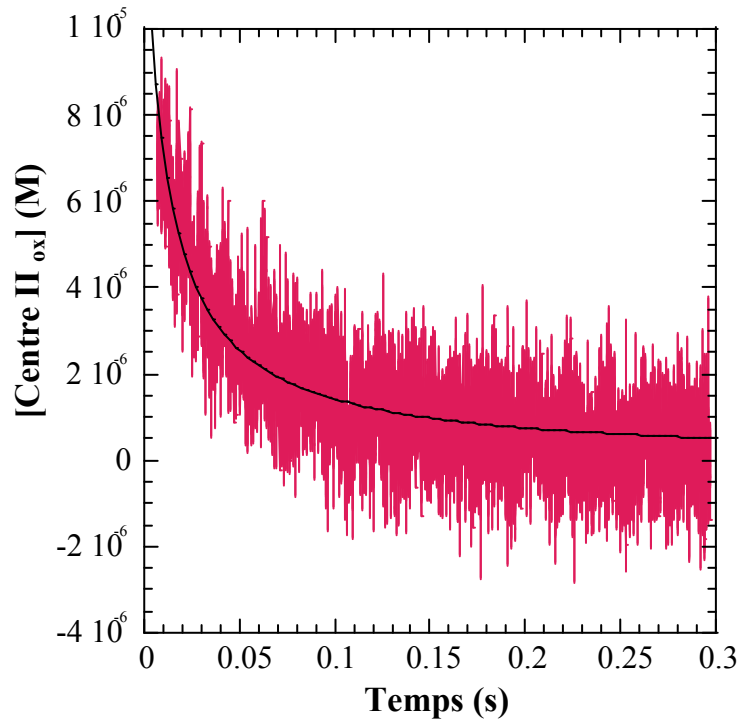


Figure 41 : Variation de la concentration du Centre II oxydé. Les cinétiques sont enregistrées en variation d'absorbance à 644 nm, après le mélange de 50 μL de SOR $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ à 40 μM avec de 50 μL de SOR $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ à 40 μM , 25 mM Tris/HCl pH 7.6 au stopped-flow à 25°C. La trace est modélisable par l'équation $[\text{Centre II}_{\text{ox}}] = 1/(k+1/[\text{Centre II}_{\text{ox}}]_0)$ avec $k = 6.28 \pm 0.89 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $[\text{Centre II}_{\text{ox}}]_0 = 14.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$, décrivant une cinétique d'ordre deux.

Dans ces conditions, et d'après les données de la Figure 40, les deux centres de la SOR (Centre II_{ox} et Centre I_{red}) réagissent ensemble de manière stoechiométrique (réaction 1). Cela suggère que la cinétique de cette réaction doit être du second ordre :

$$v = k [\text{Centre II}_{\text{ox}}][\text{Centre I}_{\text{red}}]$$

Cela se vérifie en effet pour la trace de la Figure 41 qui est modélisable par une équation du type $[\text{Centre II}_{\text{ox}}] = 1/(k + 1/[\text{Centre II}_{\text{ox}}]_0)$ correspondant à une cinétique du deuxième ordre dans le cas où $[\text{Centre II}_{\text{ox}}] = [\text{Centre I}_{\text{red}}]$. La constante de vitesse de ce processus est de $6.28 \pm 0.89 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $[\text{Centre II}_{\text{ox}}]_0 = [\text{Centre I}_{\text{red}}]_0 = 14.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$.

D'après le mélange réalisé précédemment (Figure 40), les deux centres de la SOR réagissent ensemble de manière stoechiométrique (réaction 1). En effet, autant de Centre II réduit que de Centre I oxydé sont mesurés au final. De plus la cinétique obtenue en stopped-flow est modélisable par une cinétique d'ordre 2. Ainsi la vitesse de transfert d'électrons entre les deux centres interprotéiques semble définie par l'équation : $v = k [\text{Centre II}_{\text{ox}}][\text{Centre I}_{\text{red}}]$ avec $k = 6.28 \pm 0.89 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Nous pouvons remarquer que la valeur $[\text{Centre II}_{\text{ox}}]_0$ calculée à partir des données stopped-flow est légèrement sous-estimée. En effet l'enregistrement à 644 nm qui permet de suivre la réduction de Centre II, inclut aussi une petite contribution du Centre I. Pendant la réduction du Centre II, la même concentration de Centre I s'oxyde (réaction 1). Pour être rigoureux, il faudrait tenir compte de la contribution du Centre I dans la variation de l'absorbance à 644 nm. Cependant l'oxydation du Centre I et la réduction du Centre II se déroule en même temps, avec la même constante de vitesse, cela n'entraîne donc aucun biais sur la valeur de la constante de vitesse calculée.

Le transfert d'électrons du Centre I au Centre II présente donc une constante de vitesse de l'ordre de $6.28 \pm 0.89 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Cette cinétique est rapide, compatible avec un processus de réduction du Centre II par les réductases qui passeraient par le Centre I. Ces données peuvent expliquer pourquoi lors de la réduction de la SOR, une réduction séquentielle du Centre II puis du Centre I est observée. En effet, les réductases peuvent réduire le Centre I qui va lui-même réduire le Centre II de manière très rapide. Une fois tout le Centre II réduit, la réduction du Centre I va pouvoir se dérouler. Ces données appuient donc l'hypothèse que le Centre I joue un rôle de relais électronique entre la réductase et le Centre II de la SOR, mais que ce transfert d'électrons se fait de façon intermoléculaire, entre deux molécules de SOR (Figure 42).

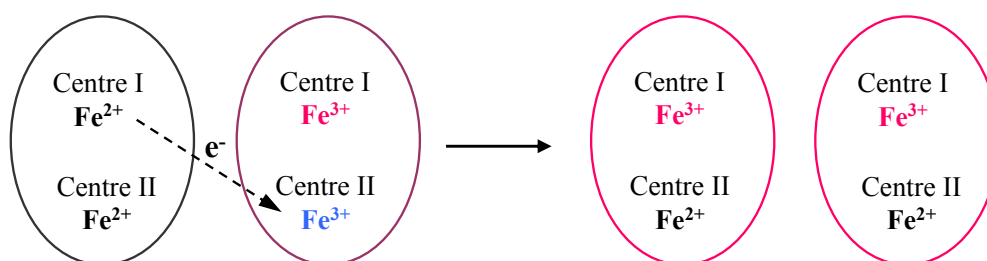


Figure 42 : Schéma du transfert d'électrons interprotéique Centre I- Centre II.

C. Mutant C13S

Afin d'étudier l'importance du Centre I dans les processus de transfert d'électrons des réductases vers le Centre II, nous avons construit un mutant de la SOR dépourvu de Centre I. Ce mutant nous permettra de confirmer le rôle de relais électronique pour le Centre I.

Chez la SOR de *D. vulgaris*, la mutation d'une des cystéines du Centre I en sérine a été effectuée afin d'empêcher l'incorporation du fer sur ce centre (Emerson et coll, 2003). Les auteurs n'observent aucun effet sur l'activité catalytique de la SOR, ni sur la constante de

vitesse du transfert d'électrons entre le Centre II de la SOR et la rubrédoxine. Nous avons réalisé la mutation de la cystéine 13 en sérine sur la SOR de *D. baarsii*. La cystéine 13 étant ligand du fer du Centre I, cette mutation doit induire une démetalation sur ce centre.

Le mutant C13S de la SOR de *D. baarsii* a été caractérisé (cf. Annexe 1). Ce mutant présente un spectre d'absorption UV-visible identique à celui de la SOR de *T. pallidum*, une SOR contenant naturellement seulement le Centre II (Santos-Silva et coll, 2006). Ainsi seule la bande caractéristique du Centre II oxydé à 644 nm est toujours présente. Les propriétés redox de ce Centre II semblent inchangées. Enfin, la réactivité de ce mutant vis-à-vis du superoxyde a été étudiée en radiolyse pulsée et sa réactivité est similaire à celle de la SOR sauvage. Ce mutant C13S constitue donc un excellent outil pour étudier le rôle du Centre I dans les processus de transfert d'électrons des réductases vers le Centre II.

Rôle du Centre I dans la réduction de la SOR avec Fpr

L'effet de la suppression du Centre I dans le mutant C13S sur la réduction du Centre II par la Fpr est étudié dans les mêmes conditions que pour la SOR sauvage (Figure 43).

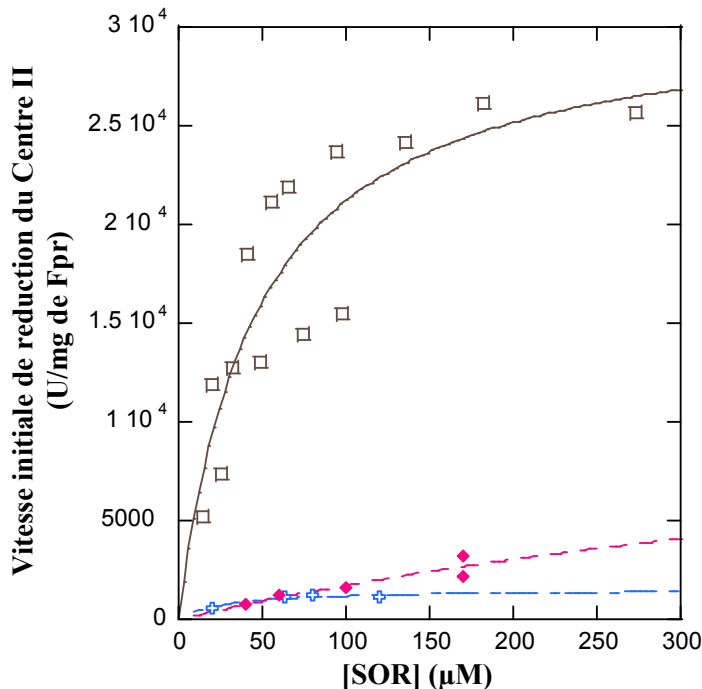


Figure 43 : Vitesse initiale de la réduction de la SOR sauvage (□) et du mutant C13S (+) de *D. baarsii*, de la SOR de *T. pallidum* (♦) par la Fpr en fonction de [SOR]. Les vitesses sont mesurées en anaérobiose, à 25 °C, par la diminution de l'absorbance à 644 nm en présence de différentes concentrations de SOR, 800 μM de NADPH et une quantité catalytique de 3.5 mg/L de Fpr dans 25 mM Tris/HCl, pH 7.6.

1 Unité enzymologique : 1 nmole de Centre II réduite par minute.

La suppression du Centre I de la SOR de *D. baarsii* réduit considérablement la vitesse de la réduction de la SOR par la Fpr. Un effet très similaire à celui du mutant C13S est observé avec la SOR de *T. pallidum*, qui naturellement ne contient que le Centre II.

Ces données suggèrent fortement que la réduction du site actif de la SOR par la Fpr passe par la réduction du Centre I qui réduit alors quasi instantanément le Centre II. En absence du Centre I, la Fpr peut réduire le Centre II de la SOR mais avec une vitesse 30 fois inférieure à celle observée lorsque le Centre I est présent.

Nous avons testé si la présence de relais électronique entre la Fpr et le Centre II du mutant C13S pouvait restaurer l'efficacité de la réduction de la Fpr. Les relais électroniques testés sont le cytochrome c (Cyt c), la rubrédoxine (Rub) de *Clostridium Pasteurianum* et des extraits de *E. coli* surexprimant la rubrédoxine de *D. baarsii* (Figure 44). La rubrédoxine de *C. Pasteurianum* possède un potentiel redox de - 77 mV/ENH (Lin et coll, 2003). Elle est donc susceptible de réduire les deux centres de la SOR. La rubrédoxine de *D. baarsii* n'a pas encore été caractérisée. Le Cyt c de cœur de cheval possède un potentiel redox de + 250 mV/ENH (Myer et coll, 1979), assez proche de celui du Centre II de la SOR (+ 370 mV/ENH).

Protéines de transfert d'électrons	V _{initiale} de réduction de la SOR (U/mg de Fpr)	
	SOR C13S	SOR sauvage
/	451	10598
Cyt c (20 µM / 40 µM)	2195 / 2480	10824
Extrait protéique de <i>E. coli</i> où la Rub de <i>D. baarsii</i> est surexprimée	9020	11049
Rub <i>C. Pasteurianum</i> (5 µM)	9019	9471

Figure 44 : Vitesse initiale de réduction de la SOR sauvage et du mutant C13S de *D. baarsii* par la Fpr en présence de différentes protéines de transfert d'électrons. La solution contient initialement 100 µM de SOR oxydée, 600 µM de NADPH dans 100 µL Tris/HCl 10 mM à pH 7.6. La réaction est initiée par l'ajout de 0.233 µg de Fpr et se déroule en anaérobiose à 25°C. 1 unité (U) correspond à 1 nmole de Centre II réduite par minute.

L'ajout de 20 µM de Cyt c permet d'augmenter la vitesse de réduction de la SOR C13S par la Fpr mais sans toutefois atteindre les valeurs obtenues avec la SOR sauvage. L'augmentation de la concentration de Cyt c à 40 µM ne permet pas d'augmenter cette vitesse

de réduction. Cette vitesse est donc limitée par la réduction du Cyt c par la Fpr ou par le transfert d'électrons du Cyt c au Centre II. Cependant, l'ajout de rubrédoxine de *C. Pasteurianum* pure ou d'extraits de *E. coli* contenant la rubrédoxine de *D. baarsii* surexprimée, permet d'augmenter la vitesse de réduction de la SOR par la Fpr jusqu'à retrouver les valeurs obtenues avec la SOR sauvage. La rubrédoxine semble donc jouer le rôle de relais électronique entre la Fpr et le Centre II de la SOR dans le cas de la SOR mutée C13S. Notons que les valeurs de la vitesse de réduction de la SOR sauvage ne sont pas augmentées par la présence de cytochrome c, de rubrédoxine de *C. Pasteurianum* ou d'extrait de *E. coli* où la rubrédoxine *D. baarsii* a été surexprimée.

Afin de vérifier que la réduction de la SOR par la rubrédoxine de *C. Pasteurianum* n'est pas limitée par la réduction de la rubrédoxine par la Fpr, l'expérience suivante a été réalisée. La cinétique de réduction de la rubrédoxine par la Fpr est suivie au spectrophotomètre UV/visible à 490 nm ($\epsilon_{490 \text{ nm}} = 8\,850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), longueur d'onde caractéristique de la rubrédoxine oxydée. Cette expérience est réalisée avec différentes concentrations de rubrédoxine (Figure 45).

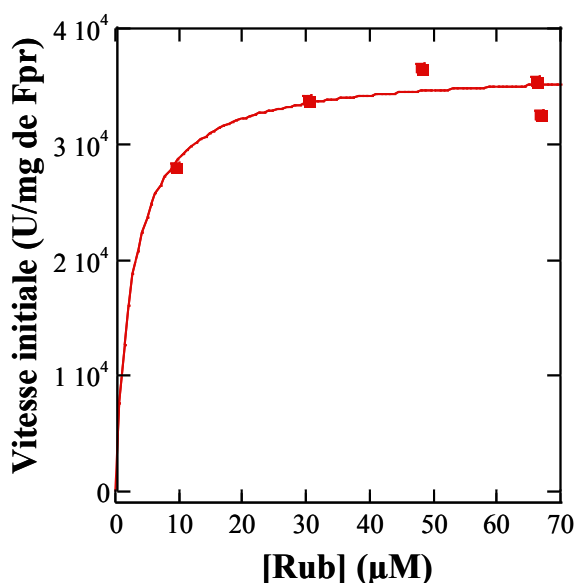


Figure 45 : Vitesse initiale de réduction de la rubrédoxine de *C. Pasteurianum* par la Fpr en fonction de la concentration de rubrédoxine, en présence de 600 μM de NADPH, dans 100 μL de Tris/HCl 10 mM à pH 7.6. La réaction est initiée par l'ajout de 0.233 μg de Fpr et se déroule en anaérobiose à 25°C. 1 Unité correspond à 1 nmole de Rubrédoxine réduite par minute.

Nous pouvons modéliser les données par une équation de Michaelis : $V_i = (V_m \times [\text{Rub}]) / (K_m + [\text{Rub}])$ avec $V_m = 36500 \pm 1500 \text{ U/mg de Fpr}$ et $K_m = 2.7 \pm 1 \mu\text{M}$. L'incertitude sur le K_m est grande car nous ne pouvons pas expérimentalement, au

spectrophotomètre UV-visible, mesurer une vitesse de réduction en présence de moins de 10 μM de rubrédoxine. L'absorbance initiale serait alors trop faible.

La vitesse de réduction de la SOR sauvage ou mutée C13S par la Fpr en présence de 5 μM de rubrédoxine de *C. Pasteurianum* est de l'ordre de 1.10^4 U/mg de Fpr. Même si nos données manquent de précision, il est clair qu'à 5 μM de rubrédoxine, la vitesse de réduction est supérieure à 1.10^4 U/mg de Fpr. La réduction de la rubrédoxine par la Fpr est donc plus rapide que la réduction de la SOR par la Fpr en présence de rubrédoxine. Dans la Figure 44, les vitesses de réduction de la SOR par la Fpr en présence de rubrédoxine ne sont donc pas limitées par la réduction de la rubrédoxine par la Fpr. Ces vitesses correspondent donc à la vitesse de réduction du Centre II par le Centre I ou par la rubrédoxine.

Ainsi la rubrédoxine de *C. Pasteurianum* semble aussi efficace que le Centre I pour réduire le Centre II de la SOR de *D. baarsii* cependant, elle est réduite par la Fpr de manière légèrement plus rapide ($k_{cat} = 22.5 \text{ s}^{-1}$) mais surtout plus efficace (k_{cat}/K_m est de $1.83 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $8.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la réduction du Centre I et de la rubrédoxine respectivement). Le fait que la rubrédoxine soit plus efficacement réduite que le Centre I par la Fpr peut être dû à la réductase considérée. Il peut en être différemment vis-à-vis d'une autre réductase.

Rôle du Centre I dans la réduction de la SOR avec Fre en présence de FMN :

Nous venons de voir que la présence du Centre I influence fortement la vitesse de réduction du site actif de la SOR par la Fpr. Afin de savoir si le rôle du Centre I dans la réduction de la SOR est une propriété propre de la SOR ou dépend de la réductase, l'activité de réduction du Centre II par la Fre a été mesurée sur la SOR sauvage et le mutant C13S de *D. baarsii* (Figure 46).

	Vitesse initiale de réduction du Centre II par Fre.
SOR sauvage	69400 U/mg de Fre
C13S	47400 U/mg de Fre

Figure 46 : Vitesse initiale de réduction du Centre II de la SOR sauvage et du mutant C13S de *D. baarsii* (120 μM) par la Fre en présence de 400 μM de NADPH, 20 μM de FMN dans 100 μL de Tris/HCl 25 mM pH 7.6. La réaction est initiée par l'ajout de 0.233 μg de Fpr et se déroule en anaérobiose à 25°C. 1 Unité correspond à 1 nmole de Centre II réduite par minute.

En présence de FMN, la vitesse de réduction de la SOR sauvage et celle de la SOR C13S sont relativement proches. Ces résultats montrent que dans le cas de Fre, le Centre I ne semble plus jouer le rôle de relais électronique pour la réduction du Centre II.

Ainsi, le rôle du Centre I en tant que relais électronique dépend de la réductase considérée. Lorsque la SOR de *D. baarsii* est réduite par la Fpr de *E. coli*, le rôle du Centre I est indispensable, lorsqu'elle est réduite par la Fre de *E. coli* son rôle semble pratiquement négligeable. Par ailleurs, diverses molécules peuvent jouer ce rôle de relais électronique au sein d'une bactérie, comme la rubrédoxine par exemple. Nous pouvons proposer que le Centre I serve de médiateur redox afin que le site actif de la SOR soit réduit efficacement par une très large gamme de réductases cellulaires, incluant notamment celles incapables de transférer les électrons directement au Centre II.

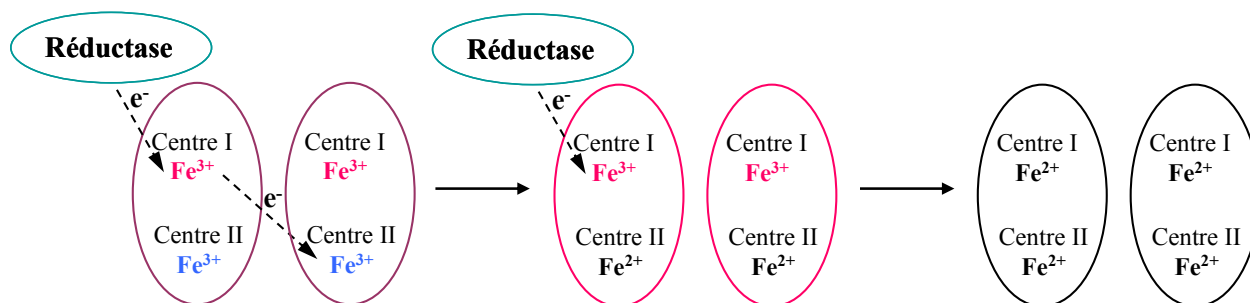


Figure 47 : Schéma du rôle proposé pour le Centre I de la SOR de *D. baarsii* lors de la réduction de la SOR par la Fpr.

Effets de la mutation C13S sur l'activité catalytique de la SOR :

Afin de regarder l'importance du Centre I dans l'activité catalytique de la SOR, nous avons étudié la capacité du mutant C13S à catalyser la réduction de $O_2^{\bullet -}$.

Il est possible d'observer une catalyse de réduction de $O_2^{\bullet -}$ en présence de SOR, de Fpr de *E. coli* ou de ferrédoxine réductase d'épinard comme source d'électrons, et de xanthine oxydase comme source de $O_2^{\bullet -}$ (Coulter et Kurtz, 2001 ; Emerson et coll, 2003 ; Mathé et coll, 2007) (Figure 49). Nous avons étudié la catalyse de réduction de la SOR mutée C13S en utilisant la NADPH flavodoxine réductase de *E. coli* (Fpr) comme source d'électrons. L'oxydation du NADPH spécifiquement associée à la présence de SOR et de $O_2^{\bullet -}$, est suivie en UV-visible à 340 nm (Figure 49, Figure 50).

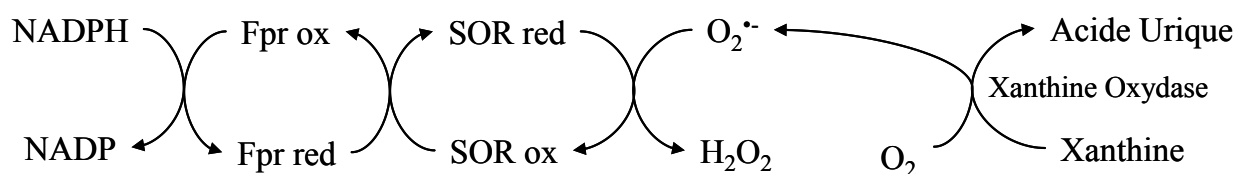


Figure 48 : Schéma de la catalyse de réduction du superoxyde en présence de SOR, de Fpr, et de NADPH.

Précédemment, il a été montré, par les techniques de radiolyse pulsée, que la SOR C13S réagit aussi rapidement avec le superoxyde que la SOR sauvage (cf. Annexe 1). L'étude de la réduction de $O_2^{\bullet -}$ en conditions catalytiques permet alors d'étudier l'effet du donneur d'électrons, ici la Fpr, sur l'activité catalytique du mutant C13S en comparaison avec la SOR sauvage.

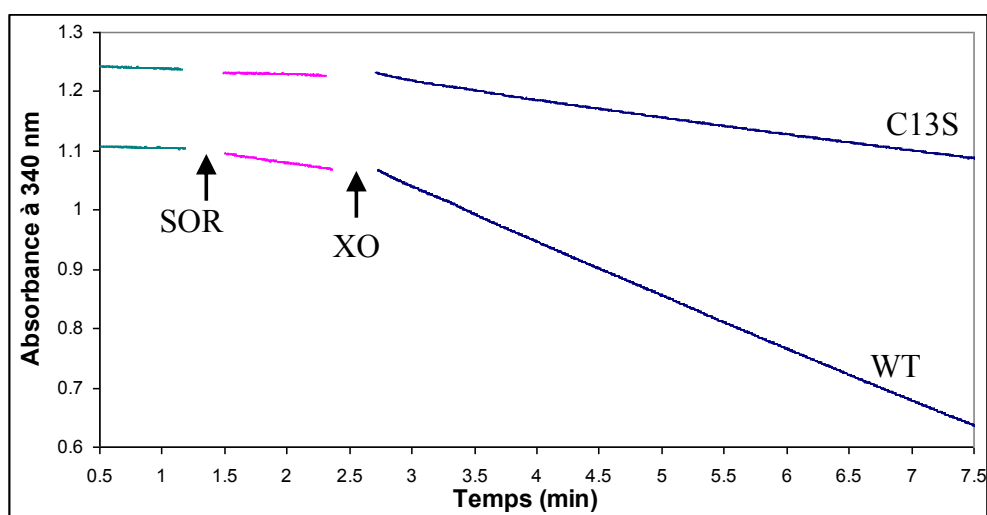


Figure 49 : Activité NADPH superoxyde oxydoréductase de la SOR sauvage et du mutant C13S de *D. baarsii*. L'oxydation de NADPH est suivie à 340 nm dans 1 mL contenant 10 mM Tris/HCl pH 7.6, 200 μ M NADPH, 500 unités/mL catalase, 500 μ M d'hypoxanthine et 1 μ M de flavodoxine réductase de *E. coli* (Fpr), à température ambiante. Après 1 min, 1 μ M de SOR, sauvage ou C13S, est ajouté et après 2 min 30 s, une quantité de xanthine oxydase (XO) permettant de produire un flux de superoxyde de 22 μ M/min est ajoutée.

En absence de superoxyde, le système NADPH-Fpr-SOR présente une très faible activité NADPH oxydase. En présence du générateur de $O_2^{\bullet -}$ (XO), nous observons une activité NADPH superoxyde réductase (Figure 49). La valeur de cette activité s'obtient en soustrayant activité oxydase en absence $O_2^{\bullet -}$ à l'activité déterminé en sa présence. Le mutant C13S présente une activité NADPH superoxyde réductase seulement 2 fois plus faible que

celle de la SOR sauvage. Ce résultat est à priori surprenant car nous avons vu précédemment que la SOR C13S est réduite 30 fois plus lentement par la Fpr par rapport à la SOR sauvage.

SOR	[Fpr] (μ M)	vitesse d'oxydation du NADPH (μ M/min) ^a
SOR sauvage	1	9.4
SOR C13S	1	4.1
SOR sauvage	0.25	2
SOR C13S	0.25	1.1

^a la vitesse d'oxydation du NADPH est mesurée après l'ajout de la XO, moins la consommation basale mesurée avant l'ajout de XO.

Figure 50 : Activité NADPH superoxyde oxydoréductase de la SOR sauvage et du mutant C13S de *D. baarsii* en conditions catalytiques. Conditions expérimentales identiques à celles de la Figure 49.

Lorsque [Fpr] est diminuée par quatre, le rapport de l'activité de la SOR sauvage par rapport à celle de la SOR C13S reste identique. Le mutant reste toujours deux fois moins actif (Figure 50). Cela suggère que dans ce test catalytique, le processus de réduction de la SOR par la Fpr est limitante. Ce test démontre néanmoins que la SOR C13S est capable de réaliser une catalyse de réduction de $O_2^{\cdot -}$ en présence de Fpr comme donneur d'électrons.

Il serait intéressant toutefois de regarder si l'activité du mutant C13S en présence de rubrédoxine retrouverait son niveau initial.

En conclusion, nos données montrent que le Centre I joue le rôle de relais électronique entre les réductases et le Centre II lorsque ces réductases réduisent plus efficacement le Centre I que le Centre II. L'importance du Centre I dans la réduction de la SOR dépend donc de la nature des réductases. La réduction interprotéique entre les deux centres de la SOR est très rapide, et donc compatible avec le rôle de relais électronique du Centre I. Ainsi, nous pouvons proposer que le rôle du Centre I est de permettre à la SOR de s'adapter à une gamme le plus large possible de réductases cellulaires et d'être le plus efficace possible dans son activité de détoxification du superoxyde quelques soient les réductases présentes dans la cellule.

III. Rôle de réductases de *E. coli* dans l'activité SOR *in vivo*

A. Rôle de la Fpr *in vivo*

Afin de déterminer l'importance de la NADPH-flavodoxine-oxydoréductase (Fpr) pour l'activité catalytique de la SOR dans *E. coli*, les phénotypes des souches de *E. coli* exprimant la SOR dans un contexte *sodA⁻sodB⁻* et *sodA⁻sodB⁻fpr⁻* ont été étudiés.

Le gène *fpr* est régulé par le facteur de transcription *soxRS* et est induit en condition de stress superoxyde (Liochev et coll, 1994). Les souches *sodA⁻sodB⁻* de *E. coli* sont très sensibles au stress oxydant du fait de leur incapacité à détoxifier le radical superoxyde (Carlioz et Touati, 1986). La croissance de ses souches sur milieu minimum est nulle. L'expression de la SOR dans ces souches restaure leur croissance sur milieu minimum. En effet, les dihydroxyacides déshydratases inhibés par le superoxyde, sont indispensables à la biosynthèse des acides aminés branchés (Pianzzola et coll, 1996). En présence de SOR la croissance est rétablie (Pianzzola et coll, 1996 et Figure 51). La croissance de ses souches contenant le plasmide pMJ25 codant pour la SOR, reflète l'efficacité de la SOR pour l'élimination du superoxyde. Nous avons étudié l'effet de la l'expression de *fpr* sur l'activité SOR en étudiant la croissance des souches *sodA⁻sodB⁻ fpr⁺* et *sodA⁻sodB⁻ fpr⁻* exprimant la SOR en absence des acides aminés branchés (Isoleucine, Leucine et Valine) (Figure 51).

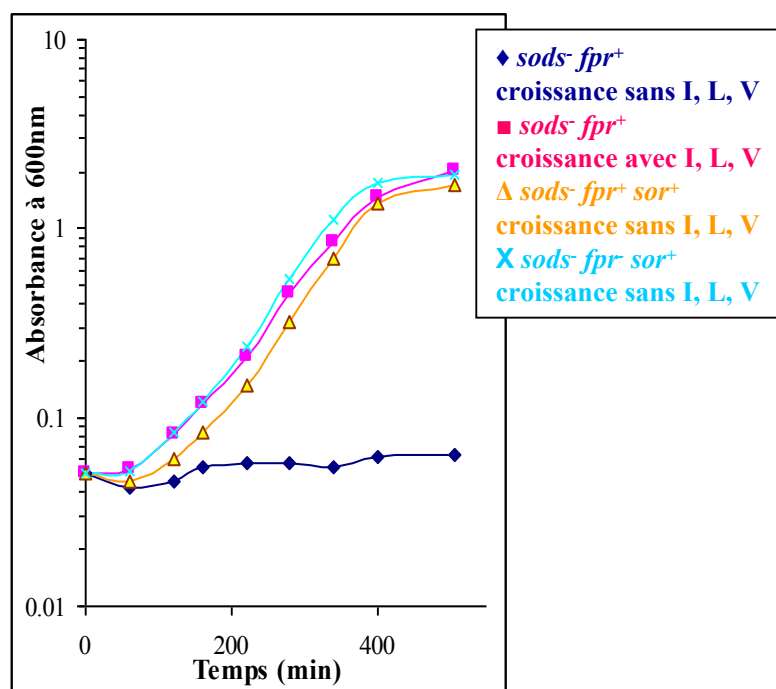


Figure 51 : Effet de la mutation *fpr*⁻ sur l'activité SOR *in vivo* dans *E. coli*. La croissance des souches QC2965 (*sodA*⁻*sodB*⁻ *fpr*⁺), QC2965 + pMJ25 (*sodA*⁻*sodB*⁻ *fpr*⁺ *sor*⁺) et QC 2973 + pMJ25 (*sodA*⁻*sodB*⁻ *fpr*⁻ *sor*⁺) est réalisée sur milieu minimum M9 complété en glucose, thiamine, et tous les acides aminés sauf les acides aminés branchés (Ile, Val et Leu). L'absorbance à 600 nm des cultures est mesurée au cours du temps. 2 mM d'IPTG sont ajoutés aux cultures possédant le plasmide pMJ25 codant pour la SOR.

Aucun effet significatif sur la croissance n'est observé dans les souches *fpr*⁻ par rapport aux souches *fpr*⁺ (Figure 51). Il semble donc que dans ces conditions, la Fpr ne soit pas indispensable pour l'activité SOR. Il est possible que la réductase Fpr ne soit pas une réductase spécifique de la SOR. Son absence pourrait être compensée par d'autres réductases toutes aussi efficaces pour transférer les électrons à la SOR. L'étude de la réduction de la SOR par des extraits protéiques de *E. coli* possédant ou non la Fpr est présentée en annexe (cf. Annexe 2). Cette étude suggère la présence de réductases efficaces autres que la Fpr, notamment des systèmes impliquant les flavines libres.

B. Rôle de la Fre *in vivo*

Effet de la délétion de Fre sur le phénotype *sor*⁻ :

De même que précédemment pour la Fpr, l'importance de Fre pour l'activité SOR réductase *in vivo* a été étudiée. Pour cela, nous avons observé la croissance des souches *sodA*⁻*sodB*⁻ *fre*⁺ et *sodA*⁻*sodB*⁻ *fre*⁻ en absence des acides aminés branchés (Isoleucine, Leucine et

Valine). En conditions de stress oxydant, la croissance des souches *sodA⁻sodB⁻* en absence de la SOR est nulle. En présence de SOR, la croissance est rétablie (Pianzzola et coll, 1996 et Figure 52).

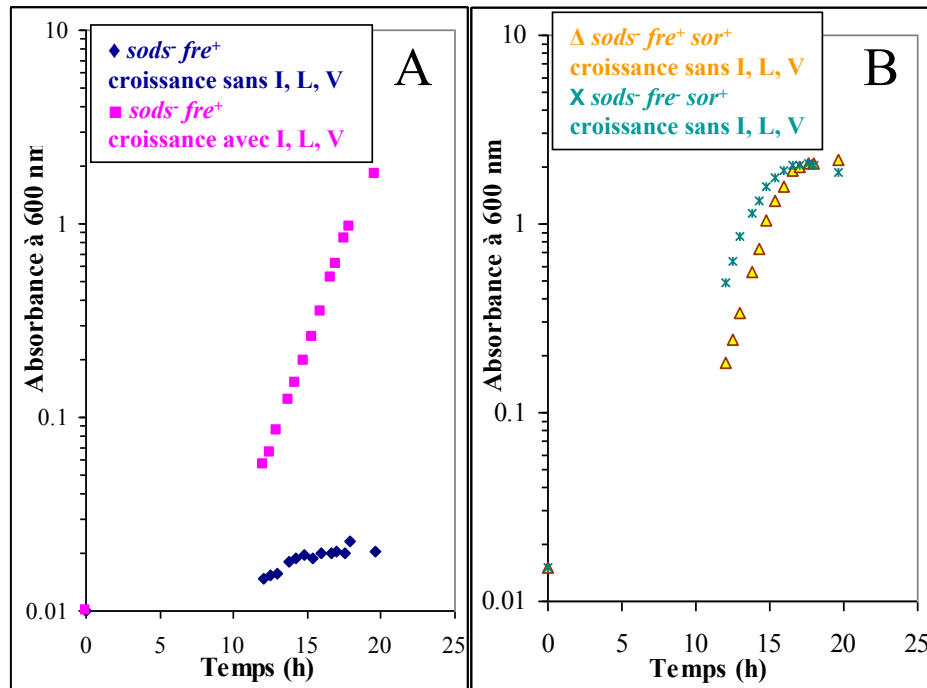


Figure 52 : Effet de *fre* sur l'activité SOR *in vivo* chez *E. coli*. La croissance des souches QC1790 (*sodA⁻sodB⁻fre⁺*), QC1790 (*sodA⁻sodB⁻fre⁺sor⁺*) et QC 1927 (*sodA⁻sodB⁻fre⁻sor⁺*) est réalisée sur milieu minimum M9 complété en glucose, thiamine et tous les acides aminés sauf les acides aminés branchés (Ile, Val et Leu). L'absorbance à 600 nm des cultures est mesurée au cours du temps. 2 mM d'IPTG sont ajoutés aux cultures possédant le plasmide pMJ25 codant pour la SOR.

Aucun effet significatif n'est observé sur la croissance des souches *fre⁻* par rapport aux souches *fre⁺*.

Effet de la délétion de *fre* sur la sensibilité au paraquat :

La sensibilité au paraquat des souches de *E. coli* exprimant la SOR dans un contexte *sodA⁻sodB⁻* et *sodA⁻sodB⁻fre⁻* a été étudiée (Pianzzola et coll, 1996). Le paraquat induit un stress superoxyde dans les cellules (Bus et Gibson, 1984). La croissance des souches *sodA⁻sodB⁻* montre une sensibilité au paraquat dès une concentration de 50 μ M (Carlioz et Touati, 1986). La production de SOR au sein de cette souche *sodA⁻sodB⁻* restaure une croissance normale (Pianzzola et coll, 1996).

Les croissances des souches *sodA⁻sodB⁻fre⁺* et *sodA⁻sodB⁻fre⁻* exprimant la SOR, sont étudiées avec des concentrations croissantes de paraquat.

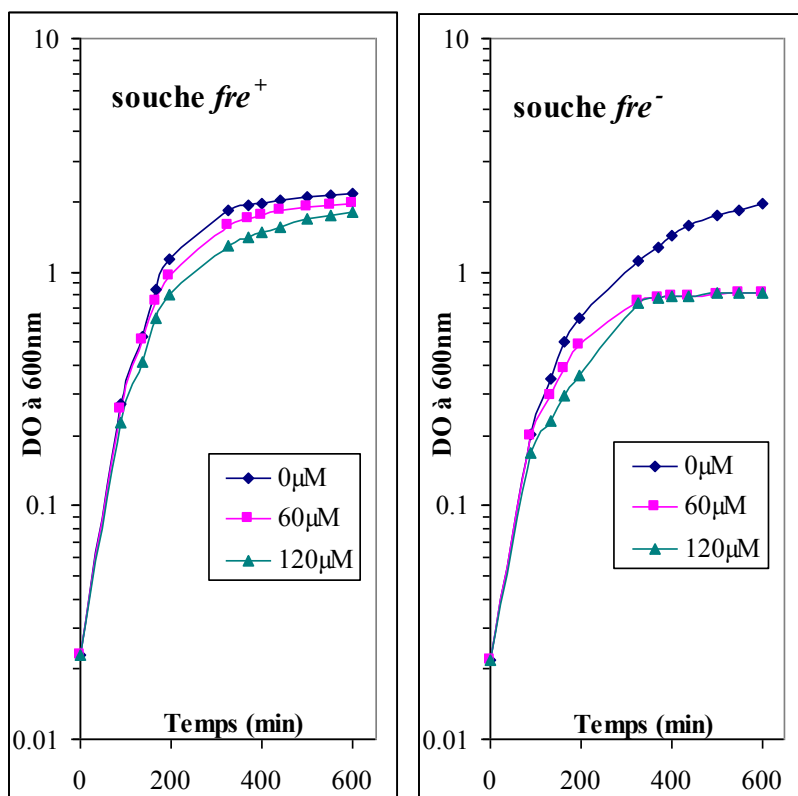


Figure 53 : Effet de *fre* sur la sensibilité au paraquat. La croissance des souches QC1790 (*sodA*⁻*sodB*⁻*fre*⁺*sor*⁺) et QC 1927 (*sodA*⁻*sodB*⁻*fre*⁻*sor*⁺) est observée en présence de 0, 60 et 120 µM de paraquat. 2 mM d'IPTG sont également ajoutés aux cultures.

Une augmentation de la sensibilité au paraquat est observée sur la croissance de la souche *fre*⁻ (Figure 53). L'effet observé est proche de celui observé lors de la suppression de l'expression de la SOR dans ces souches (Pianzzola et coll, 1996). La suppression du gène *fre* augmente la sensibilité de la souche au paraquat, montrant que cette réductase de *E. coli* a une importance dans la réduction de la SOR de *D. baarsii*. En absence de la Fre, l'activité SOR est affectée et la croissance de ces mutants est ralentie.

La Fre joue un rôle important dans l'activité SOR dans *E. coli*. L'importance de cette réductase dans l'activité SOR n'a pas été observée en absence de paraquat (Figure 52) car d'autres réductases réduisent efficacement la SOR. En présence de paraquat le stress oxydant est augmenté, les réductases présentes ne parviennent plus à compenser l'activité de la Fre.

L'ensemble de ces résultats montre que *E. coli* contient plusieurs réductases cytosoliques capables de réduire la SOR de *D. baarsii*, et qu'il n'existe pas un seul système spécifique pour cette réduction. Il est primordial de noter que le système étudié est hétérologue, la SOR étant de *D. baarsii*, en présence de réductases de *E. coli*. Le site actif de

la SOR a un potentiel redox élevé (+ 370 mV/ENH) et est très exposé au solvant (Nivière et coll, 2004), il est donc assez facile à réduire (le potentiel redox du cytoplasme de *E. coli* est environ – 200 mV/ENH). La SOR semble essentiellement réduite par des protéines ayant une activité flavine réductase telle la Fre. Ainsi dans *E. coli*, la réduction de la SOR peut être assurée en grande partie par les systèmes flavines, libres ou cofacteurs. *E. coli* possède principalement trois flavines réductases solubles, avec par ordre décroissant d'importance : la NAD(P)H:flavine oxydoréductase (Fre), la sulfite réductase (SiR) et la ferrédoxine:NADP oxydoréductase (Fpr). La suppression de la principale d'entre elles, la Fre, semble avoir un effet sur l'activité SOR. Ainsi, même si la SOR semble s'adapter à différentes réductases, dans *E. coli* elle présente une préférence pour la Fre. Chez les bactéries sulfato réductrices, le génome de *Desulfovibrio desulfuricans* qui exprime un SOR a été séquencé. Il possède plusieurs gènes dans son génome, annotés comme flavines réductase. Cette étude suggère que chez les bactéries sulfato réductrices, les flavines réductases soient impliquées dans l'activité SOR.

Chapitre IV :
**Mécanisme réactionnel de la SOR avec le
superoxyde**

I. Effet photochimique

A. Un effet photochimique associé aux expériences de radiolyse pulsée

Ces dernières années le mécanisme réactionnel de la SOR de *D. baarsii* avec le superoxyde a été bien étudié par radiolyse pulsée (Rodrigues et coll, 2006 ; Emerson et coll, 2002 ; Nivière et coll, 2004). Dans ces expériences, une cellule de quartz contenant la solution de SOR est placée à l'extrémité d'un accélérateur d'électrons. Une brève impulsion d'électrons (quelques nanosecondes) va permettre par radiolyse de l'eau, en présence de formiate et de O_2 dans la cellule, de générer de façon quasi instantanée et homogène dans la solution de SOR une quantité bien définie de $O_2^{\cdot-}$, proportionnelle à la dose d'irradiation.

Le déclenchement de l'impulsion d'électrons dans l'accélérateur est couplé à l'éclairage d'une lampe xénon ou tungstène qui va permettre de suivre les variations de l'absorbance de la solution de SOR irradiée en fonction du temps immédiatement après la formation de $O_2^{\cdot-}$. Ces variations d'absorbance sont mesurées à des longueurs d'onde fixes dans le domaine du visible à l'aide d'un monochromateur situé après la cellule de quartz (Figure 54).

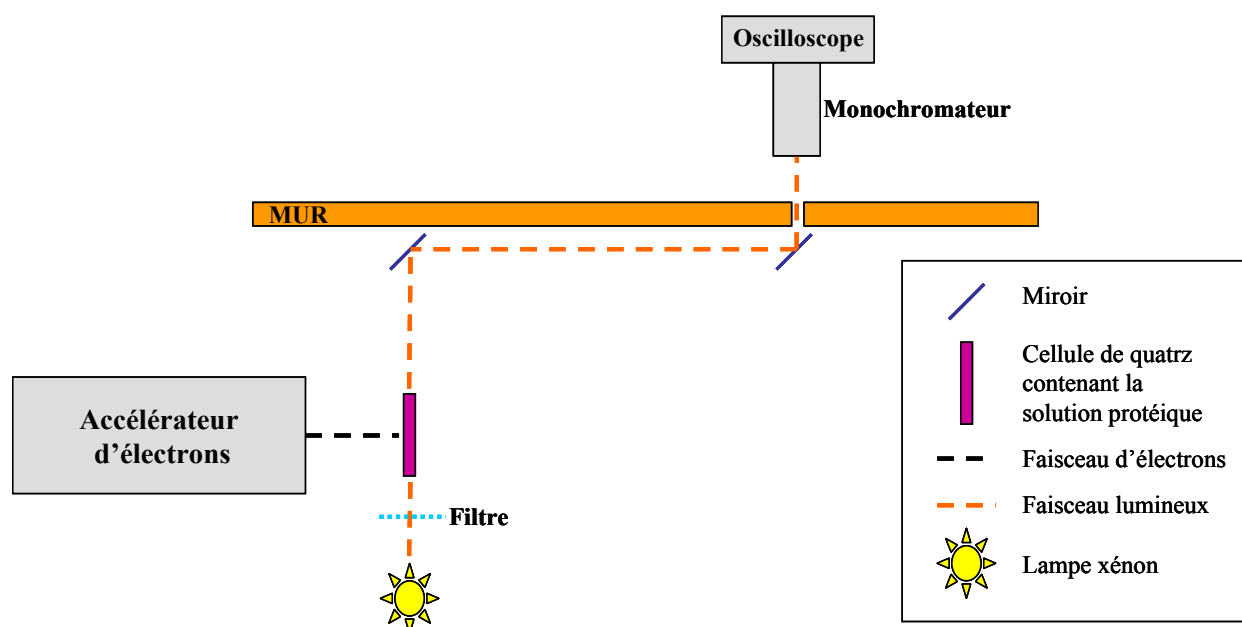


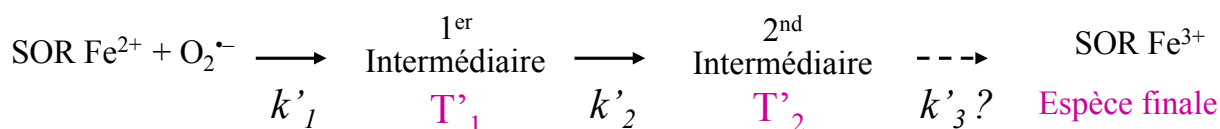
Figure 54 : Schéma de fonctionnement de la radiolyse pulsée (vu de dessus).

Dans toutes les expériences de radiolyse pulsée réalisées précédemment, une lampe xénon a été utilisée pour détecter la variation rapide d'absorbance de la SOR de *D. baarsii* durant sa réaction avec le superoxyde (Lombard et coll, 2001 ; Nivière et coll, 2004 ; Mathé et coll, 2007). Notons que la lampe xénon a un spectre d'émission assez large et intense qui va de l'UV au visible. Ainsi, dans ces conditions, lors de chaque enregistrement à la longueur d'onde sélectionnée par le monochromateur, la solution de SOR est irradiée par l'ensemble des longueurs d'onde du spectre d'émission de la lampe.

Ce type de montage est classique en radiolyse pulsée et est similaire à celui utilisé par les autres groupes de recherche étudiant la SOR par radiolyse pulsée (Rodrigues et coll, 2006 ; Emerson et coll, 2002). Notons que ce montage est un peu différent de ce qui est utilisé pour les détections UV-visible en cinétique rapide « stopped-flow ». Pour les montages de « stopped-flow », le monochromateur est généralement placé entre la lampe et l'échantillon, de sorte que dans ce cas, durant la mesure, l'échantillon n'est irradié qu'avec la longueur d'onde sélectionnée.

Dans les montages de radiolyse pulsée, pour éviter que les échantillons subissent des dommages photochimiques, un filtre est généralement placé entre la lampe et l'échantillon. Dans les expériences précédentes faites sur la SOR de *D. baarsii* à l'institut curie d'Orsay, un filtre coupant toutes les longueurs d'onde en dessous de 310 nm a été positionné entre la lampe xénon et la cellule contenant la solution de SOR, ceci afin de prévenir toute possible altération des résidus aromatiques de la protéine durant les analyses.

Des données préliminaires nous ont indiqués que l'utilisation de filtre coupant les longueurs d'onde au dessus de 310 nm pouvait modifier certaines cinétiques observées en radiolyse pulsée. Nous avons donc réalisé les expériences de radiolyse pulsée avec la SOR de *D. baarsii* à pH 7.6, mais en présence de différents filtres, coupant les longueurs d'onde en dessous de 345, 395, 425 ou 530 nm, entre la lampe xénon et la cellule de l'échantillon. Le schéma réactionnel précédemment déterminé pour la SOR de *D. baarsii* :



Ce mécanisme réactionnel est donc réétudié en présence de ces différents filtres.

La cinétique de formation du premier intermédiaire réactionnel T_1 décrite par k_1 est étudiée dans des conditions de pseudo premier ordre avec 8 μM de superoxyde et 100 μM de SOR. La constante k_1 est inchangée quel que soit le filtre utilisé. Cette réaction correspond

toujours à une réaction du second ordre entre la SOR et le superoxyde avec une constante de vitesse k_I égale à $(1.0 \pm 0.2) 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Cependant nous observons que le spectre d'absorption du 1^{er} intermédiaire réactionnel T_1 est légèrement différent lorsqu'il est obtenu en présence d'un filtre coupant en dessous de 310 nm ou de filtres coupant en dessous de 345, 395, 425 et 530 nm. En effet, comme le montre la Figure 55, avec des filtres de 345 à 530 nm, le spectre possède toujours une bande large d'absorption centrée à 600 nm, d'allure similaire à celle obtenue avec le filtre à 310 nm, mais avec une valeur d'epsilon 1.6 fois plus faible.

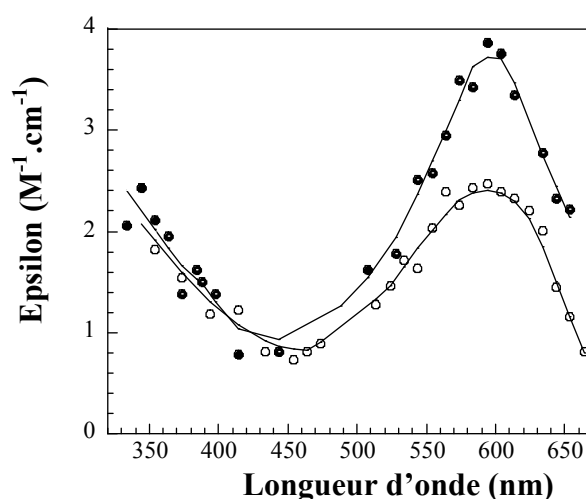


Figure 55 : Spectres d'absorption du 1^{er} intermédiaire réactionnel formé 100 μs après le début de la réaction de la SOR (100 μM) dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6 avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ (2.8 μM), généré par radiolyse pulsée. Lampe xénon, (●) avec un filtre coupant en dessous de 310 nm, (○) avec un filtre coupant en dessous de 345, 395, 425 ou 530 nm.

De plus, en présence des filtres coupant en dessous de 345, 395, 425 ou 530 nm, les amplitudes et les cinétiques décrivant l'évolution du 1^{er} intermédiaire réactionnel T_1 , sont différentes de celles obtenues avec un filtre coupant en dessous de 310 nm (Figure 56). Ces modifications sont particulièrement visibles aux longueurs d'onde comprises entre 600 et 650 nm. Toutes les traces obtenues avec le filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 345 nm sont identiques à celles obtenues avec les filtres coupant en dessous de 395, 425 ou 530 nm, à toutes les longueurs d'onde étudiées entre 400 et 720 nm. Dans la suite, seules les expériences réalisées avec le filtre coupant en dessous de 345 nm seront présentées.

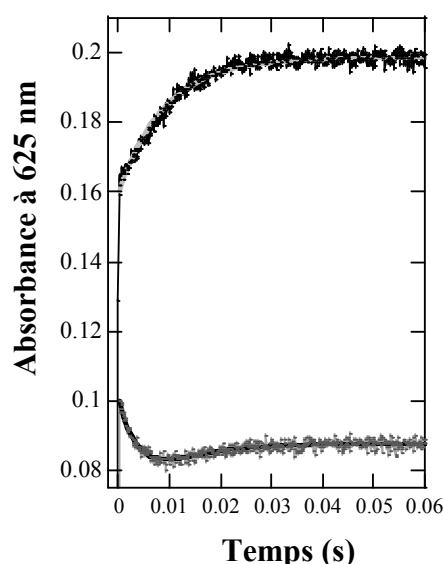


Figure 56 : Cinétiques enregistrées à 625 nm durant la réaction de la SOR de *D. baarsii* (100 μ M) dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl à pH 7.6 avec $O_2^{\bullet-}$ (20 μ M) généré par radiolyse pulsée, en présence d'un filtre coupant en dessous de 310 nm (**trace du haut**), ou d'un filtre coupant en dessous de 345 nm (**trace du bas**) entre la lampe xénon et la solution de SOR. Les courbes en pointillées représentent une modélisation de la cinétique par un processus exponentiel (haut) $A = A_1 \exp(-k_2 \times t) + A_2$, où $k_2 = 110 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, ou par un processus bi-exponentiel (bas) $A = A_1 \exp(-k_2 \times t) - A_2 \exp(-k_3 \times t) + A_3$, où $k_2 = 259 \pm 22 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 108 \pm 10 \text{ s}^{-1}$.

En présence du filtre coupant en dessous de 310 nm, à toutes les longueurs d'onde étudiées entre 450 et 700 nm, l'évolution du 1^{er} intermédiaire a été décrit comme correspondant à un processus mono-exponentiel, avec une constante de vitesse de $550 \pm 50 \text{ s}^{-1}$ à pH 7.6 (Lombard et coll, 2001 ; Nivière et coll, 2004). Dans ces conditions, ce premier intermédiaire évolue vers un second intermédiaire, présentant une fine bande d'absorption à 625 nm (Nivière et coll, 2004 et Figure 58). En présence du filtre coupant en dessous de 345 nm, l'évolution du 1^{er} intermédiaire est plus complexe, elle correspond à deux phases. Les amplitudes de ces deux phases sont clairement visibles lorsque la SOR réagit avec une quantité importante de $O_2^{\bullet-}$ (20 μ M) (Figure 56). Toutes les traces entre 450 et 650 nm peuvent être modélisées par une bi-exponentielle. Les valeurs des constantes de vitesse k_2 et k_3 sont de $255 \pm 27 \text{ s}^{-1}$ et $110 \pm 24 \text{ s}^{-1}$, respectivement. Nous avons observé que ces constantes de vitesse k_2 et k_3 sont indépendantes de la concentration de SOR lorsque la [SOR] varie de 50 à 200 μ M. Ces données suggèrent qu'en présence du filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 345 nm, le 1^{er} intermédiaire évolue successivement vers deux espèces, T_2 et T_3 . Le spectre d'absorption du 2nd intermédiaire T_2 ne peut pas être déterminé expérimentalement car il évolue rapidement vers T_3 avant d'être totalement formé, les valeurs de k_2 et k_3 sont en effet proches. Le spectre de T_2 a été reconstruit par calcul, à partir de chaque cinétique obtenue tous

les 5 à 10 nm entre 450 et 750 nm, par extrapolation de la double exponentielle modélisant l'évolution du 1^{er} intermédiaire. En effet, ces traces sont modélisables par l'équation $A = A_1 \exp(-k_2 \times t) - A_2 \exp(-k_3 \times t) + A_3$, où A est l'absorbance à un temps donné; A_1 et A_2 , représentent l'amplitude de chacune des deux phases ; A_3 correspond à l'absorbance en fin de réaction (Figure 57). Les constantes de vitesse, k_2 et k_3 sont fixées à 255 et 110 s⁻¹, respectivement pour toutes les traces analysées entre 450 et 750 nm. L'absorbance de T_2 à une longueur d'onde donnée est déterminée par la valeur $A_3 - A_2$ (Figure 57). Le spectre du second intermédiaire est donc ainsi reconstruit par calcul.

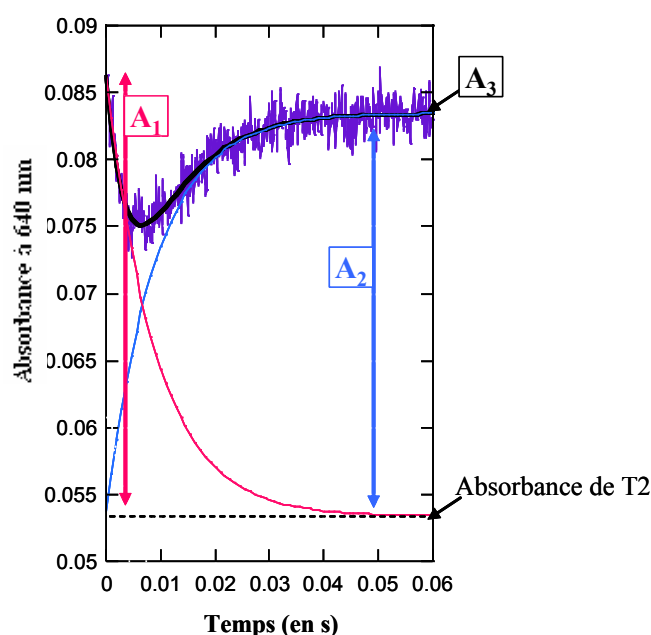


Figure 57 : Cinétique enregistrée à 640 nm (violet) durant la réaction de la SOR de *D. baarsii* (100 μ M) dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl à pH 7.6 avec $O_2^{\bullet-}$ (20 μ M) généré par radiolyse pulsée, en présence de la lampe xénon et d'un filtre coupant en dessous de 345 nm. La courbe **noire** est la modélisation de la cinétique par un processus bi-exponentiel $A = A_1 \exp(-255 \times t) - A_2 \exp(-110 \times t) + A_3$ avec, $A_1 = 0.0333$, $A_2 = 0.0301$ et $A_3 = 0.0835$. Les courbes rose et bleue représentent chacune l'une des deux phases du modèle bi-exponentiel, correspondant soit à la formation du T_2 (rose) $A = A_1 \exp(-255 \times t) - A_2 + A_3$ soit à celle de du T_3 (bleu) $A = A_3 - A_2 \exp(-110 \times t)$.

Comme le montre la Figure 58, le spectre calculé de T_2 présente une bande large centrée autour de 570 nm. Ce spectre ressemble au spectre de la SOR oxydée en milieu basique, qui correspond à une espèce Fe^{3+} -OH (Mathé et coll, 2005). Le spectre d'absorption du T_3 qui est formé 25 ms après le début de la réaction, peut être déterminé directement d'après les valeurs des absorbances à $t = 25$ ms aux différentes longueurs d'onde entre 450 et 750 nm. Le spectre du T_3 est identique à celui de la SOR oxydée par 8 μ M de superoxyde (Figure 58). Ces données montrent qu'en présence d'un filtre coupant en dessous de 345 nm, T_3 est le produit final attendu de la réaction, c'est-à-dire la SOR oxydée résultant de

l'oxydation stœchiométrique de la SOR par $O_2^{\bullet-}$. Notons que T_2 comme T_3 ne présentent pas dans leur spectre d'absorption une fine bande centrée à 625 nm comme celle observée avec le filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 310 nm (Figure 61).

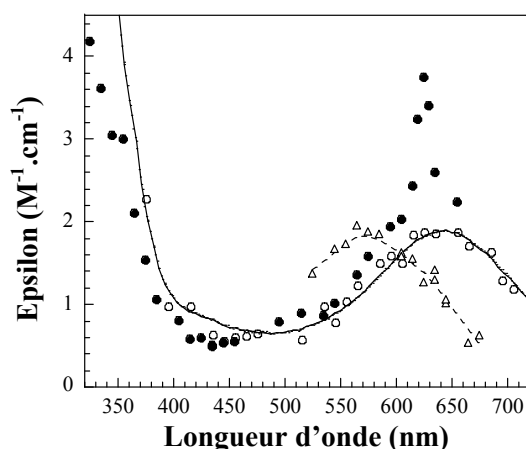


Figure 58 : Spectres d'absorption obtenus avec la lampe xénon, des intermédiaires réactionnels T_2 et T_3 formés entre 10 ms et 60 ms après le début de la réaction de la SOR (100 μ M) dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6, avec $O_2^{\bullet-}$ (8 μ M), généré par radiolyse pulsée. (●) Spectre du T_2 formé en présence d'un filtre à 310 nm, 25 ms après le début de la réaction, (Δ) spectre du T_2 formé en présence d'un filtre à 345 nm, calculé d'après le modèle bi-exponentiel des cinétiques obtenues à différentes longueurs d'onde. (o) Spectre du T_3 formé en présence d'un filtre à 345 nm, 60 ms après le début de la réaction. La ligne pleine représente le spectre UV-visible de la solution 1 min après la fin de la réaction (100 μ M SOR dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6, réagissant avec 8 μ M $O_2^{\bullet-}$), réalisé avec le filtre à 310 nm ou le filtre à 345 nm et en présence de 500 unités/mL de catalase.

Ces résultats suggèrent que la fine bande d'absorption observée à 625 nm sur le T_2 lors de la réaction de la SOR avec le superoxyde et en présence du filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 310 nm est directement liée à la présence de la lumière émise par la lampe xénon entre 310 et 345 nm. Cette bande à 625 nm pourrait donc provenir d'un phénomène photochimique concernant une espèce présente dans la cellule avec une bande d'absorption dans la région de 310 à 345 nm. En effet, si le phénomène photochimique apparaît lors d'irradiation entre 310 et 345 nm, il doit avoir pour origine une espèce présente dans le milieu réactionnel avec une bande d'absorption dans la région de 310 à 345 nm.

Ces expériences de radiolyse pulsée ont été répétées avec une lampe tungstène à la place de la lampe xénon. Alors que la lampe xénon émet jusqu'à 250 nm, le spectre d'émission de la lampe tungstène décroît considérablement en dessous de 500 nm. Avec la lampe tungstène, les cinétiques de la SOR avec $O_2^{\bullet-}$ ne sont pas affectées par la présence ou l'absence de filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 310 ou 345 nm et sont identiques à celles obtenues avec la lampe xénon en présence d'un filtre à 345 nm. Ces

données concordent avec le fait que la formation de la fine bande à 625 nm sur le T₂ est induite par l'illumination de la solution de SOR par les longueurs d'ondes en dessous de 345 nm.

B. Les produits de la réaction

Afin de déterminer si le phénomène photochimique observé durant les expériences de radiolyse pulsée en présence de lampe Xénon induit des modifications dans le bilan global de la réaction de la SOR avec le superoxyde, 20 µM de SOR sont mis à réagir avec 16.5 µM de superoxyde généré par radiolyse pulsée, en présence d'une lampe xénon et d'un filtre coupant à 310 nm ou à 345 nm. Un spectre d'absorption UV-visible de la solution est enregistré une minute après le début de la réaction et l'H₂O₂ produit est dosé. Dans tous les cas, en présence du filtre à 310 ou à 345 nm, la solution présente un spectre caractéristique de SOR oxydée à 16 µM avec une bande à 644 nm, en accord avec une oxydation stœchiométrique de la SOR par O₂^{•-} (Figure 58). Nous remarquons que la fine bande d'absorption à 625 nm obtenue sur le second intermédiaire en présence de filtre à 310 nm a disparu. Cette SOR oxydée est toujours redox active, elle peut être réduite par de l'ascorbate et oxydée par du chlorure d'iridium. De plus, une analyse par spectrométrie de masse en mode électrospray révèle qu'il n'y pas d'altération de la masse de la chaîne polypeptidique de la SOR durant les expériences de radiolyse pulsée, que la réaction soit réalisée en présence d'un filtre à 310 nm ou à 345 nm. La SOR analysée en fin de réaction présente une masse de 14 022 Da dans les deux cas.

La quantification de H₂O₂ produit est réalisée par la technique de dosage HRP/LCV, une minute après la réaction de la SOR avec O₂^{•-}. Il est à noter que la radiolyse de l'eau entraîne la formation d'une faible quantité de H₂O₂ (rendement radiolytique G≈0.07 µmol J⁻¹) (Daniels et Wigg, 1966). La quantification de H₂O₂ est réalisée avec une dose de 27 Gy générant 16.5 µM de O₂^{•-}. 1.8 µM de H₂O₂ radiolytique sont donc aussi formés, en plus de l'H₂O₂ qui apparaîtra par la réaction de la SOR avec le superoxyde. En présence du filtre à 310 nm ou de celui à 345 nm, lorsque 20 µM de SOR réagit avec 16.5 µM de O₂^{•-}, immédiatement après l'impulsion H₂O₂ est dosé et corrigé de l'H₂O₂ radiolytique :

- avec le filtre à 310 nm → 10.5 ± 1.2 µM de H₂O₂
- avec le filtre à 345 nm → 13.6 ± 0.3 µM de H₂O₂

En présence du filtre à 345 nm, la quantité de H₂O₂ retrouvée en fin d'expérience (13.6 µM) est proche de celle attendue pour une réduction à un électron du superoxyde (16.5

μM). En présence du filtre à 310 nm, la quantité de H_2O_2 retrouvée en fin d'expérience est un peu plus faible que celle attendue, mais indique cependant que la plupart du superoxyde qui a réagi avec la SOR est transformé en H_2O_2 .

Ces données montrent donc que le phénomène photochimique observé durant la l'oxydation de la SOR en présence du filtre à 310 nm ne modifie pas le bilan global de la réaction de la SOR avec $\text{O}_2^{\bullet-}$. Il est donc clair que la fine bande d'absorption centrée à 625 nm sur le second intermédiaire réactionnel, en présence d'un filtre à 310 nm, n'est pas une caractéristique de la réaction de la SOR avec le superoxyde, mais correspond à un phénomène photochimique transitoire, qui ne modifie pas le bilan de la réaction.

C. Propriétés photochimiques des intermédiaires réactionnels de la SOR

Afin de déterminer si ce phénomène photochimique peut être associé à une propriété particulière d'un intermédiaire réactionnel formé durant la réaction de la SOR avec le superoxyde ou s'il provient de la SOR elle-même, plusieurs expériences ont été réalisées.

i) Lorsque l'expérience de radiolyse pulsée est effectuée en absence de SOR dans la solution, aucune bande d'absorption transitoire dans la région des 625 nm n'est observée. Cette fine bande n'est donc pas associée à un artefact de l'instrument

ii) Nous avons regardé l'influence de la concentration du superoxyde sur le maximum d'absorption de la bande à 625 nm du spectre de l'intermédiaire formé en présence du filtre à 310 nm. Les expériences de radiolyse pulsée sont réalisées avec une dose d'irradiation croissante, permettant de faire réagir 3, 5 et 9 μM de superoxyde avec un excès de SOR en présence de filtres coupant les longueurs d'onde en dessous de 310 ou de 345 nm. La variation d'absorbance est enregistrée à 625 nm et mesurée 25 ms après le début de la réaction. Cette valeur d'absorbance en fin de réaction est directement proportionnelle à la quantité de superoxyde généré par radiolyse pulsée (Figure 59). En présence du filtre 310 nm, l'absorbance à 625 nm en fin de réaction est supérieure à celle observée en présence du filtre 345 nm. Cela reflète le fait que la valeur de l'épsilon à 625 nm en présence du filtre 310 nm est 2.1 fois supérieure à celle en présence du filtre à 345 nm (Figure 58). Ces données confirment que la formation de la fine bande d'absorption à 625 nm est directement liée à la réaction de la SOR avec le superoxyde. En effet, si le processus photochimique responsable de la bande à 625 nm était indépendant de la réaction avec $\text{O}_2^{\bullet-}$, la droite obtenue en présence

du filtre à 310 nm serait parallèle à celle obtenue avec le filtre à 345 nm mais avec une valeur à l'origine non nulle, reflétant la valeur de l'épsilon du processus photochimique $[O_2^{\bullet-}]$ indépendant.

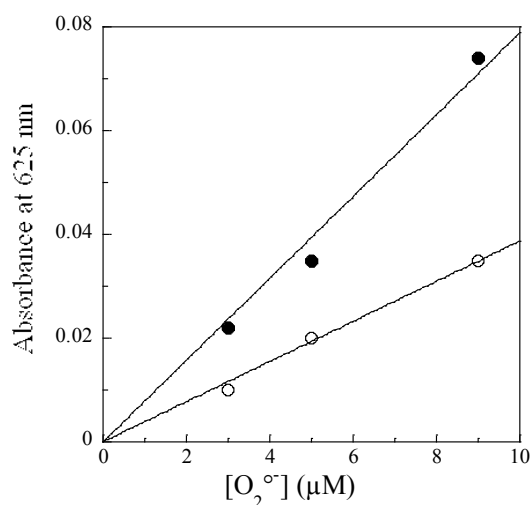


Figure 59 : Variation de l'absorbance à 625 nm enregistrée après 25 ms de la réaction entre la SOR de *D. baarsii* (100 μM) dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6 avec des concentrations croissantes de $O_2^{\bullet-}$ généré par radiolyse pulsée. Lampe xénon et filtre coupant en dessous de 310 nm (●), ou filtre coupant en dessous de 345 nm (○).

iii) Des expériences de photolyse éclair (Flash photolysis) avec une lampe xénon sont réalisées sur la SOR oxydée et réduite, en absence de superoxyde, afin de contrôler que l'effet photochimique observé en radiolyse pulsée n'est pas dû à la SOR elle-même. Un échantillon de SOR à 10 μM dans 10 mM formiate, 10 mM Tris/HCl à pH 7.6 est illuminé avec une lampe xénon (150 W) en présence d'un filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 305, 345 ou 390 nm. La variation d'absorbance de la solution est enregistrée à 625 nm en fonction du temps, de 1 ms après le flash jusqu'à 1 s. Pour la SOR oxydée comme pour la SOR réduite et quel que soit le filtre utilisé, aucun signal d'absorbance n'est détecté à 625 nm après le flash xénon. La SOR oxydée $Fe^{3+}Glu$ et la SOR réduite Fe^{2+} ne sont donc pas à l'origine du phénomène photochimique observé durant les expériences de radiolyse pulsée.

En conclusion, l'ensemble des données présentées ici démontrent que le phénomène photochimique observé en radiolyse pulsée est spécifiquement lié à la présence d'un intermédiaire réactionnel photosensible qui se forme durant la réaction de la SOR avec le superoxyde. Cependant, nous avons montré que ce processus photochimique, lorsqu'il se produit, ne modifie pas le bilan global de la réaction de la SOR avec $O_2^{\bullet-}$.

D. Une espèce Fe^{3+} -OOH à l'origine du phénomène photochimique ?

Un des intermédiaires réactionnels de la réduction du superoxyde par la SOR est une espèce de type fer (hydro)peroxo. Le phénomène photochimique observé étant spécifiquement lié à un intermédiaire réactionnel, il est donc possible qu'une espèce Fe^{3+} -OOH soit à l'origine de ce phénomène. Actuellement, du fait de la réaction très rapide de la SOR avec le superoxyde, les intermédiaires réactionnels ne peuvent pas être directement piégés et leurs propriétés photochimiques ne peuvent pas être directement étudiées. Par contre, en faisant réagir la SOR avec un léger excès de H_2O_2 , une espèce de type Fe^{3+} -OOH peut être piégée par congélation rapide dans l'azote liquide (Mathé et coll, 2006 ; Mathé et coll, 2007). Ces espèces Fe^{3+} -OOH ont été obtenues à partir de mutants de la SOR (SOR E47A ou SOR E114A) qui induisent une certaine stabilisation du fer-peroxyde et facilitent leur piégeage par simple congélation. Bien que l'espèce Fe^{3+} -OOH formée par réaction avec H_2O_2 n'est pas forcément strictement identique à celle formée avec $\text{O}_2^{\cdot-}$, elle permet cependant d'étudier les propriétés d'un fer-peroxyde que le site actif de la SOR peut accommoder. Nous avons donc étudié les propriétés photochimiques de l'espèce Fe^{3+} -OOH formée par réaction de H_2O_2 avec le mutant E47A. Notons que pour ce mutant les études en radiolyse pulsée en présence du filtre à 310 nm ont montré la présence du même phénomène photochimique que celui observé avec la SOR sauvage, caractérisé par l'apparition de la bande d'absorbance à 625 nm (Nivière et coll, 2004).

1. Expériences UV-visible à basse température

L'expérience suivante a été réalisée avec le microspectrophotomètre du laboratoire Cryobench de l'ESRF, en collaboration avec le Dr. Dominique Bourgeois (IBS Grenoble). Ce microspectrophotomètre permet de réaliser des mesures d'absorption et de spectroscopie de résonance Raman sur des solutions protéiques congelées. 1 μL d'une solution de SOR E47A Fe^{2+} (4 mM) a été mélangé avec 6 équivalents de H_2O_2 , puis rapidement congelé sous un flux d'azote gazeux à 100 K. Un Spectre de résonance Raman est alors enregistré. Ce spectre présente une vibration $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$ à 438 cm^{-1} et une vibration $\nu(\text{O}-\text{O})$ à 850 cm^{-1} , caractéristiques d'une espèce fer-peroxyde. L'espèce SOR E47A Fe^{3+} -OOH est donc formée.

Le spectre d'absorbance UV-visible de cette espèce congelée présente le même type de bandes qu'à température ambiante, cependant étant plus fines, elles laissent apparaître plus de détails. La solution congelée est irradiée 30 secondes par une lampe xénon de 150 W. Cependant la fibre optique utilisée pour acheminer la lumière Xénon sur l'échantillon diminue fortement la puissance de cette lumière. Un spectre d'absorption UV-visible est réalisé avant et après l'irradiation Xénon (Figure 60). Aucune apparition de bande à 625 nm n'a été observée. Une autre illumination de 30 s est alors réalisée avec un laser à 355 nm. Ce laser extrêmement puissant illumine encore fortement entre 310 et 345 nm. De nouveau, aucune bande à 625 nm telle que celle observée durant les expériences de radiolyse pulsée en présence du filtre à 310 nm n'est observée (Figure 60).

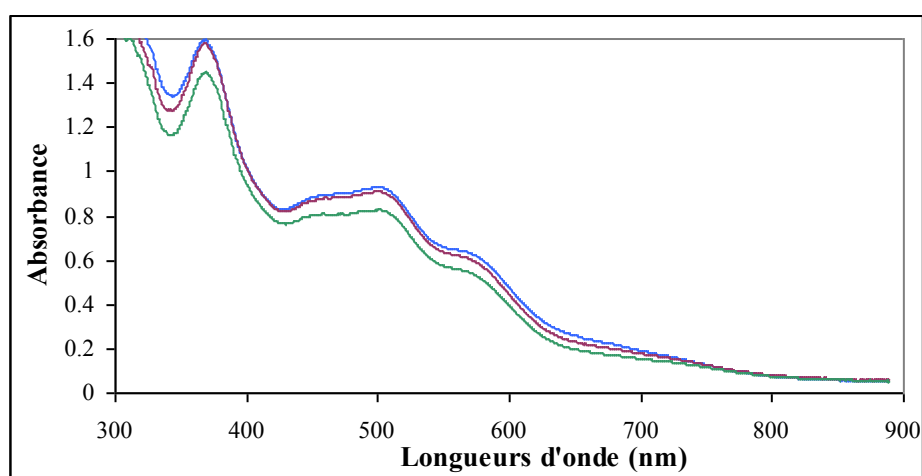


Figure 60 : Spectres UV-visible enregistrés à 100 K d'une solution contenant la SOR E47A Fe^{3+} -OOH dans 50 mM Tris/HCl à pH 8.5 avant (bleu) et après une illumination de 30 s (violet) avec une lampe xénon 150 W, puis après une illumination de 30 s (vert) avec un laser à 355 nm.

Il est possible que l'espèce photochimique observée en radiolyse pulsée soit transitoire et ne puisse pas être observée dans les conditions de la Figure 60. Cela est d'ailleurs conforté par le fait qu'à l'issue des expériences de radiolyse pulsée, les spectres finaux ne montrent plus de bande fine à 625 nm (Figure 58).

2. Expérience RPE à basse température

Le fait que cette bande à 625 nm soit très fine pourrait suggérer que l'espèce formée par photochimie soit radicalaire. Nous avons réalisé des spectres RPE avant et après irradiation par une lampe xénon, de l'espèce Fe^{3+} -OOH piégée par congélation. Dans cette expérience, un filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 305 nm a été positionné entre la lampe xénon et la solution protéique, ceci afin de prévenir toute possible altération

des résidus aromatiques de la protéine durant l'irradiation. La RPE est une technique spectroscopique tout à fait adaptée pour identifier la présence de radicaux. Trois différents tubes RPE sont réalisés. L'un contient une solution de 150 μM de SOR E47A sous forme Fe^{2+} . Un autre contient 150 μM de SOR E47A préalablement oxydée avec 2 équivalents d'iridium, donc sous forme Fe^{3+} . Enfin le dernier est réalisé en mélangeant 150 μM de SOR E47A Fe^{3+} avec 6 équivalents H_2O_2 et congelé dans l'azote liquide 20 à 30 secondes après le mélange. Dans ces conditions, le site actif de la SOR est sous forme $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ (Mathé et coll, 2002).

Pour chaque tube, un spectre RPE est réalisé avant et après une exposition de 30 secondes à une lampe xénon 150W placée à 20 cm du tube. Durant cette exposition, le tube RPE est maintenu dans de l'azote liquide à l'aide d'un cryostat. Avant l'exposition, les spectres RPE ne présentent, aucun signal caractéristique de radical, attendu autour de $g = 2$ (3400 Gauss). Après l'exposition de 30 secondes à la lampe xénon, le tube contenant la protéine sous forme Fe^{2+} ne présente aucun signal. Le tube contenant la SOR E47A sous forme $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ présente un signal caractéristique d'un radical autour de $g = 2$ (3400 gauss). Cependant, le tube contenant la SOR E47A sous forme Fe^{3+} (oxydée à l'irridium IV) présente également ce même signal après exposition.

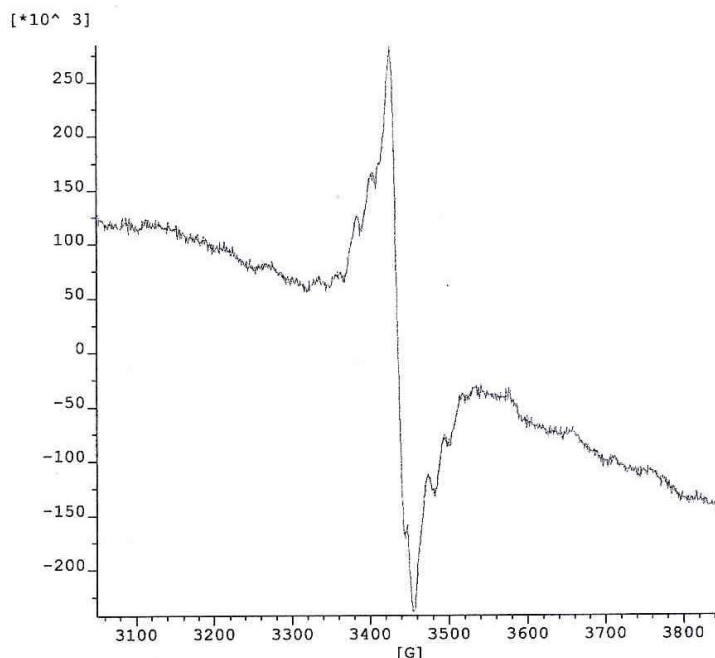


Figure 61 : Signal RPE caractéristique d'une espèce radicalaire observée sur la SOR E47A (150 μM) sous forme $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ou $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ dans du Tris/HCl 50 mM pH 8.5 après exposition 30 s à 77 K à une lampe xénon 150 W. Conditions d'enregistrement du spectre : température, 40 K ; puissance micro-onde, 10 mW à 9.651 GHz ; modulation d'amplitude, 5G à 100kHz. Accumulé 100 fois.

Ces données montrent que la SOR Fe^{3+} -OH ou Fe^{3+} -OOH conduit à la formation d'un radical organique sur la protéine après irradiation avec une lampe xénon à 77 K. Cela n'est pas observé avec la protéine sous forme Fe^{2+} . La formation de l'espèce radicalaire ne semble donc pas liée spécifiquement à l'espèce Fe^{3+} OOH, mais associée à la présence de fer ferrique au site actif de la SOR. Nous n'avons pas pu clairement déterminer si au cours de l'irradiation à la lampe Xénon, la SOR Fe^{3+} avait subi un processus de photoréduction. En effet, il a été montré que la SOR oxydée pouvait être photoréduite (Adam et coll, 2004). Le spectre RPE de l'espèce SOR oxydée présente un signal caractéristique à $g = 4.3$. Après irradiation Xénon, le même signal RPE à $g = 4.3$ a été observé. Cependant, il faut noter que ces signaux à $g = 4.3$ sont difficilement quantifiables en terme de concentration de l'espèce Fe^{3+} .

Nous pouvons cependant proposer que le radical observé en RPE soit formé à la suite d'un processus de photoréduction du Fe^{3+} de la SOR. Le tryptophane 122 est relativement proche du site actif, à environ 4 Å de l'une des histidines ligands du fer, avec laquelle il est pratiquement coplanaire (Figure 62). Ce Trp122 est très bien conservé chez toutes les SORs. Il est tout à fait possible que ce tryptophane soit oxydé en radical organique au cours du processus de photoréduction de la SOR et conduise à la réduction à un électron du Fe^{3+} .

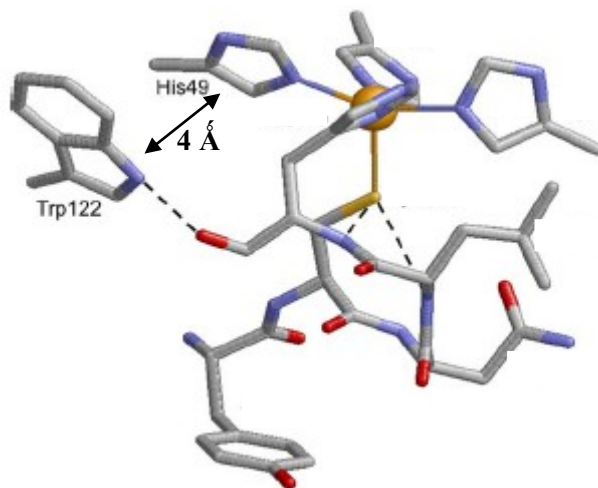


Figure 62 : Structure du site actif de la SOR de *D. baarsii*. Le fer est en orange. Le Trp 122 est coplanaire à l'His 49 ligand du fer avec une distance d'environ 4 Å entre les deux cycles.

Au cours des expériences UV-Visible et RPE à basse température sur l'espèce Fe^{3+} -OOH nous n'avons pas réussi à piéger l'espèce photochimique observée en radiolyse pulsée. Il est possible que cette espèce ne soit que transitoire et présente que lorsque l'espèce SOR Fe^{3+} -OOH est illuminé par la lampe xénon. Cela est d'ailleurs conforté par le fait qu'à l'issue

des expériences de radiolyse pulsée, les spectres finaux ne montrent pas de bande à 625 nm (Figure 58).

E. Conclusion sur l'effet photochimique

Nous avons montré que pour la SOR de *D. baarsii*, la fine bande d'absorption centrée à 625 nm qui apparaît quelques millisecondes après le début de la réaction avec $O_2^{\cdot -}$ ne correspond pas directement à une bande d'absorption d'un intermédiaire réactionnel. Elle résulte d'un effet photochimique induit par l'excitation de la lampe xénon entre 310 et 345 nm. Cette fine bande n'est associée ni à un artefact de l'instrument, ni à l'enzyme sous forme Fe^{2+} ou Fe^{3+} . Elle est caractéristique d'une espèce transitoirement formée par photochimie d'un intermédiaire réactionnel de la SOR lorsqu'il est illuminé entre 310 et 345 nm. Cela met en évidence une propriété électronique spécifique d'un des intermédiaires réactionnels de la SOR.

Actuellement, nous n'avons pas réussi à déterminer l'origine physique exacte de cet effet photochimique. Les expériences réalisées sur l'espèce fer-peroxyde, formé à partir de H_2O_2 , n'ont pas permis de mettre en évidence ce type de propriété sur cette espèce. Il est possible que le phénomène photochimique observé en radiolyse pulsée soit transitoire et ne persiste pas après l'arrêt de l'illumination par la lampe Xénon. Cela pourrait être une explication du fait que les expériences UV-visible au Cryobench et de RPE n'aient rien révélé de particulier.

Il faut noter cependant que les intermédiaires réactionnels de la SOR possèdent une bande d'absorption dans la région des 310-345 nm (Figure 55, Figure 58). Cette bande pourrait être à l'origine du phénomène photochimique. Dans tous les cas, cela met en lumière une propriété photochimique remarquable d'un de ces intermédiaires réactionnels qui n'a jamais été décrite auparavant pour des espèces de type fer-peroxyde formées au sein du site actif de la SOR. Il est important de noter que les produits finaux de la réaction sont les mêmes en présence ou non de l'effet photochimique. La réaction conduit dans les deux cas à une réduction stœchiométrique du superoxyde par la SOR. Donc, le phénomène photochimique ne modifie pas le bilan global de la réaction, il semble transitoire et sans effet sur la réaction catalysée par l'enzyme.

II. Nouveau mécanisme de la SOR

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la présence d'un effet photochimique lors des expériences de radiolyse pulsée sur la SOR de *D. baarsii* a induit un biais dans l'étude mécanistique de la SOR avec le superoxyde. En absence d'effet photochimique, les études de radiolyse pulsée de la SOR lors de sa réaction avec le superoxyde nous ont permis d'identifier deux intermédiaires réactionnels T_1 et T_2 qui évoluent vers une troisième espèce T_3 correspondante à la SOR oxydée, produit final de la réaction.

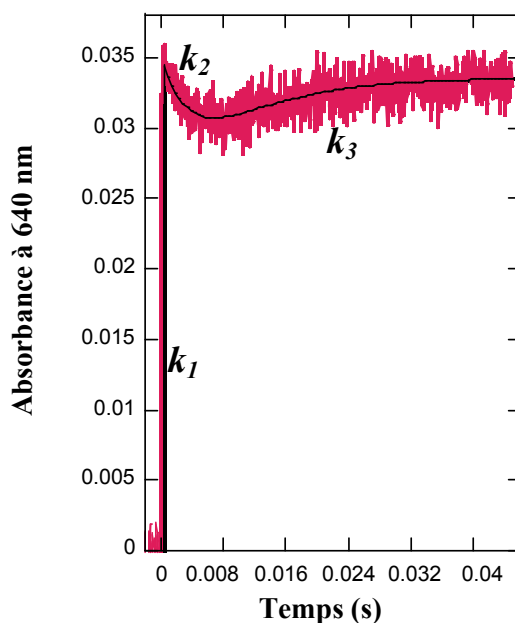


Figure 63 : Variation de l'absorbance à 640 nm de la réaction de la SOR sauvage (100 μM) avec O₂^{•-} (8 μM) généré par radiolyse pulsée dans 10 mM de formiate et 2 mM Tris/HCl à pH 7.6 en présence d'un filtre à 345 nm. Cette trace (rose) est modélisée par la somme de trois exponentielles (tracé en noir). L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Toutes les traces obtenues en absence d'effet photochimique entre 500 et 700 nm sont modélisables par la somme de trois exponentielles correspondant à la formation de trois espèces différentes : $DO = A - A_1 \times e^{(-k_1 \times x)} + A_2 \times e^{(-k_2 \times x)} - A_3 \times e^{(-k_3 \times x)}$; (avec $A = A_1 - A_2 + A_3$). Le mécanisme de la SOR peut être schématisé comme suit (Figure 64) :

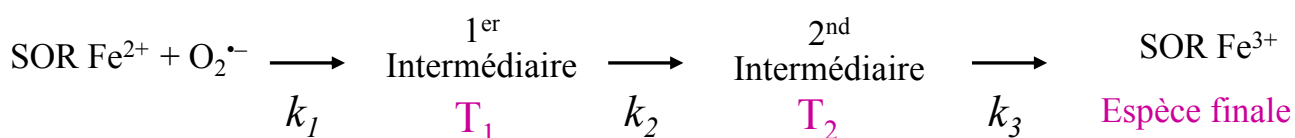


Figure 64 : Schéma du mécanisme réactionnel de la SOR de *D. baarsii* avec le superoxyde en absence d'effet photochimique.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le spectre de T_2 ainsi que les constantes de vitesse de sa formation et disparition sont très différents de ce qui avait été décrit précédemment (Nivière et coll, 2004). L'étude du mécanisme de réduction du superoxyde par la SOR de *D. baarsii* a donc été entièrement reprise sur la SOR sauvage ainsi que sur les mutants E47A et E114A, en absence de l'effet photochimique.

Par ailleurs une recherche d'inhibiteurs de la SOR a été initiée. L'effet de l'inhibition a été mesuré par l'influence des différents composés testés sur les constantes de vitesse de la réaction de la SOR avec $O_2^{\bullet-}$. Les résultats sont présentés en annexe (cf. Annexe 3).

A. Conditions expérimentales

Le formiate à une concentration minimale de 10 mM est nécessaire dans le milieu réactionnel pour générer spécifiquement une quantité définie de superoxyde lors de la radiolyse de l'eau aux cours des expériences de radiolyse pulsée (Bielski et coll, 1985). Cependant, il a été montré que le formiate sous sa forme acide, acide formique, favorisait la protonation de l'espèce fer-hydroperoxyde, formée au cours de la réaction de la SOR avec le superoxyde, chez la SOR de *D. vulgaris* (Huang et coll, 2007). L'influence du formiate/acide formique sur le mécanisme réactionnel de la SOR de *D. baarsii* a été étudiée et est développée en annexe. Il a été observé que la concentration en formiate a un effet sur la constante de vitesse k_2 et n'a aucun effet sur k_1 et k_3 . L'influence du formiate sur k_2 n'est significative qu'à $pH \leq 6.5$ si nous travaillons avec 10 mM formiate. Cet effet est corrigé sur les constantes de vitesse k_2 à $pH \leq 6.5$ présentées dans cette partie (cf. Annexe 4).

Les solutions protéiques sont placées en présence de 2 mM de tampon, afin d'avoir des concentrations de tampon bien inférieures à celle du formiate, tout en maintenant le pH désiré constant. En général, les expériences de radiolyse sont réalisées avec 100 μM SOR et des impulsions d'électrons de 13 à 32 Gy permettant de générer de 8 à 20 μM de $O_2^{\bullet-}$. En présence de 100 μM de SOR et 8 μM de superoxyde, la réaction $SOR + O_2^{\bullet-}$ est donc du pseudo premier ordre.

Pour chaque expérience, un filtre coupant toutes les longueurs d'onde en dessous de 425 nm est placé entre la lampe et la solution protéique. Les réactions sont suivies par les variations d'absorbance de la solution protéique entre 450 et 750 nm en fonction du temps.

Les cinétiques sont étudiées sur deux échelles de temps différentes. Les temps courts, enregistrant les variations d'absorbance entre 0 et 150 μs , permettent de suivre la formation

du 1^{er} intermédiaire. Les temps longs, pouvant aller jusqu'à 1 s après l'impulsion, permettent de suivre les formations du 2nd intermédiaire et des espèces oxydées finales.

B. Formation du 1^{er} intermédiaire

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence du filtre à 425 nm ne modifie pas la cinétique de formation du 1^{er} intermédiaire à pH 7.6. Il en est de même à tous les pH testés entre 5 et 10. La constante de vitesse de la réaction de la SOR avec le superoxyde est toujours de $10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Cette valeur est très élevée et proche de la limite de diffusion des molécules en solution. La vitesse de formation du premier intermédiaire est proportionnelle à [SOR] et à $[\text{O}_2^{\cdot-}]$ quelque soit le pH. La 1^{ère} étape correspond donc à une réaction bimoléculaire entre la SOR et le superoxyde. Quelque soit le pH, cette constante de vitesse est identique. Cela suggère que la formation de cet intermédiaire ne fait pas intervenir de processus de protonation ou que cette protonation n'est pas cinétiquement limitante. Le spectre du premier intermédiaire réactionnel présente une large bande d'absorption autour de 600-610 nm, indépendant du pH entre 6 et 9.5 (Figure 65).

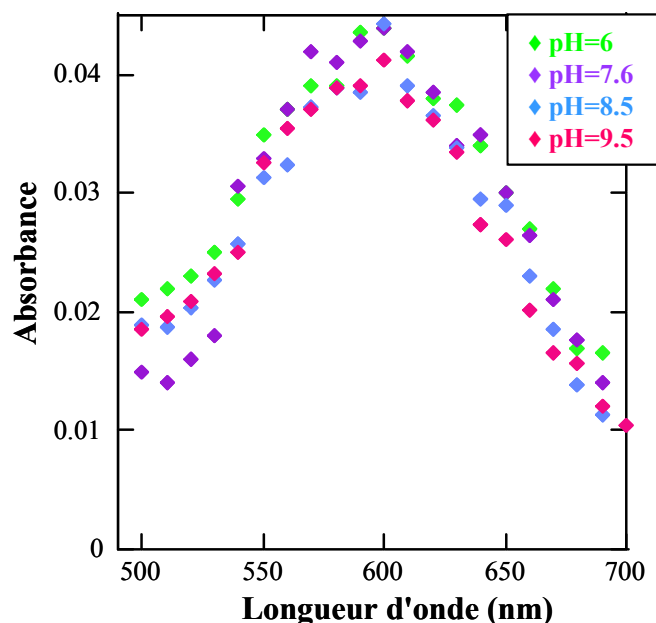


Figure 65 : Spectres du 1^{er} intermédiaire 100 μs après le début de la réaction de la SOR WT de *D. baarsii* (100 μM) avec 8 μM de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans 10 mM de formiate et 2 mM de tampon à pH 6, pH 7.6, pH 8.5 et pH 9.5. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Ces données suggèrent fortement que le premier intermédiaire résulte de la fixation du superoxyde sur le sixième site de coordination libre du fer à l'état réduit. Cette fixation peut s'accompagner d'un transfert simultané d'un électron du fer au superoxyde. Cependant des

calculs DFT sur le site actif de la SOR suggèrent que le premier intermédiaire puisse être une espèce Fe^{2+} superoxo, c'est-à-dire que le superoxyde se fixe sur le Fe^{2+} du site actif mais sans transfert d'électrons (Dey et coll, 2007). Bien que la présence d'une bande centrée à 600-610 nm pour le 1^{er} intermédiaire suggère qu'il s'agisse d'une espèce fer ferrique (Clay et coll, 2002), le groupe de Lipscomb a montré, pour l'homoprotocatechuate 2,3-dioxygénase, qu'un intermédiaire réactionnel de type Fe^{2+} superoxo présente une large bande d'absorption centrée autour de 610 nm avec un epsilon de 600 cm^{-1} (Groce et Lipscomb, 2005 ; Kovaleva et Lipscomb, 2007). Il est donc possible que dans le cas de la SOR, le premier intermédiaire T_1 puisse correspondre soit à une espèce Fe^{3+} peroxo, soit à une espèce Fe^{2+} superoxo (Figure 66).

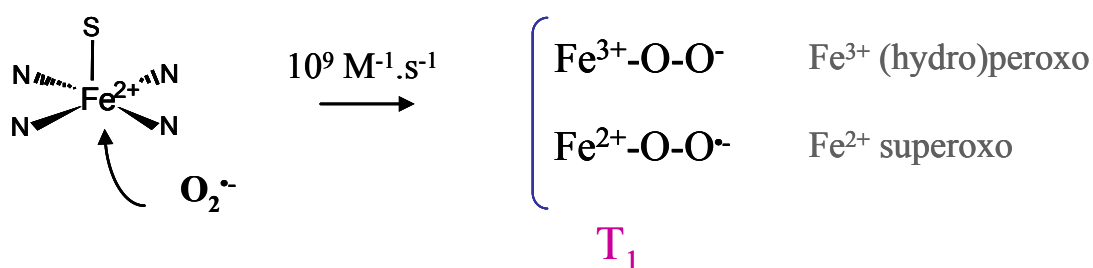


Figure 66 : Hypothèse sur la nature de T_1 .

C. Formation du 2nd intermédiaire et de l'espèce finale

1. Etude sur la SOR sauvage

1 Dépendance du k_2 au pH

Le 1^{er} intermédiaire évolue successivement vers un 2nd intermédiaire qui va ensuite former l'espèce finale, la SOR oxydée (Figure 67).

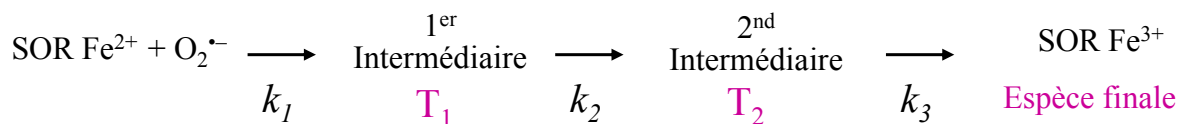


Figure 67 : Schéma du mécanisme réactionnel de la SOR de *D. baarsii* avec le superoxyde.

Comme cela a été décrit précédemment à toutes les longueurs d'onde entre 500 et 700 nm, la cinétique d'évolution du 1^{er} intermédiaire est modélisable par une double exponentielle, $A = A_1 \exp(-k_2 \times t) - A_2 \exp(-k_3 \times t) + A_3$, nous permettant de déterminer les constantes de vitesse k_2 et k_3 (Figure 68).

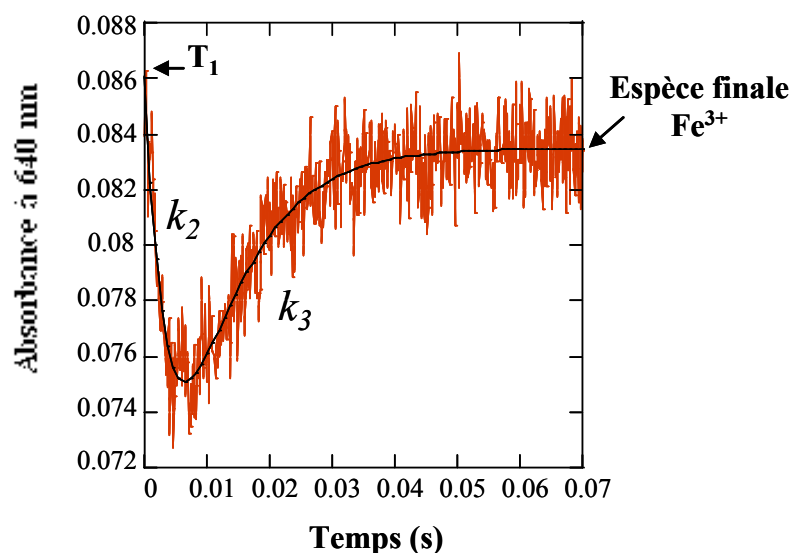


Figure 68 : Détermination des valeurs de k_2 et k_3 . L'absorbance est enregistrée à 640 nm durant la réaction de la SOR de *D. baarsii* (100 μM) dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6, avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ (20 μM), généré par radiolyse pulsée, en présence de la lampe xénon et d'un filtre à 425 nm. La cinétique est modélisable par un processus biexponentiel (tracé en noir) : $A = A_1 \exp(-k_2 \times t) - A_2 \exp(-k_3 \times t) + A_3$, avec $k_2 = 254 \pm 26 \text{ s}^{-1}$ et $k_3 = 109 \pm 9 \text{ s}^{-1}$.

La constante de vitesse de formation du second intermédiaire, k_2 , est indépendante des concentrations de SOR et de superoxyde. La formation du T_2 à partir de T_1 est donc une réaction du 1^{er} ordre. Nous avons observé une dépendance de k_2 au pH entre pH 5 et pH 8, puis une indépendance de k_2 au pH entre pH 8 et pH 10 (Figure 69). A pH < 8, le logarithme de k_2 présente une dépendance linéaire au pH : $\log k_2 = \log(k_0) - 0.61 \times \text{pH}$ où k_0 est la constante de vitesse lorsque le pH approche zéro. A pH 0, k_2 a une valeur de $6.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figure 69). Ces données montrent que dans cette gamme de pH, k_2 est proportionnelle à la concentration H_3O^+ . Cette étape correspond donc à un processus de protonation cinétiquement limitant, le proton venant de H_3O^+ .

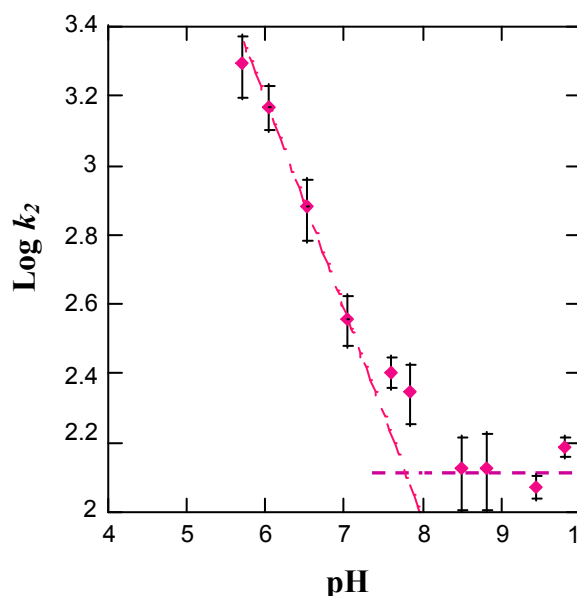


Figure 69 : Effet du pH sur la constante de vitesse k_2 de la réaction de la SOR WT de *D. baarsii* (100 μM) avec 8 μM ou 12 μM de $\text{O}_2^{\cdot-}$, dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. A pH < 8, le logarithme de k_2 présente une dépendance linéaire au pH : $(\log k_2) = 6.83 - 0.61 \times \text{pH}$.

Ces données sont en faveur d'une catalyse acide spécifique pour la formation de T_2 à pH < 8. Notons cependant que la pente déterminée dans la Figure 69 est de -0.61, soit une valeur inférieure à 1, la valeur attendue pour ce type de catalyse. Il est possible que l'environnement du site actif change légèrement en fonction du pH et influe sur la constante de vitesse de protonation ne donnant pas l'aspect d'une catalyse acide purement spécifique. Nous verrons par la suite que l'évolution de T_1 en T_2 (décrite par k_2) correspond à une réaction identique à tous les pH considérés. A pH > 8, k_2 ne montre pas de dépendance au pH mais correspond donc toujours à une étape de protonation. A ces pH, le proton nécessaire pour l'étape de protonation provient d'une molécule d' H_2O .

2 Spectre du 2nd intermédiaire

Comme cela a été dit précédemment, le spectre UV-visible du 2nd intermédiaire ne peut pas être déterminé expérimentalement. Il peut en revanche être reconstruit par l'extrapolation de la double exponentielle modélisant l'évolution du T_1 en T_2 puis en espèce finale (cf. Chapitre IV Partie I.A) $A = A_1 \exp(-k_2 \times t) - A_2 \exp(-k_3 \times t) + A_3$. Les constantes de vitesse k_2 et k_3 sont mesurées et moyennées à partir de 3 traces au minimum, ceci pour différents pH (Figure 70).

pH	k_2	Incertitude	k_3	Incertitude
5.00	2504	±384	ND	ND
5.69	1968	±393	248	±57
6.03	1479	±218	258	±51
6.53	758	±155	222	±45
7.04	360	±59	162	±23
7.60	254	±27	110	±24
7.85	223	±42	74	±11
8.50	133	±31	36	±4
8.80	135	±33	25	±8
9.45	119	±9	6	±1
9.80	155	±10	11	±2

Figure 70 : Moyenne des constantes de vitesse k_2 et k_3 de la SOR de *D. baarsii* (100 μ M) avec $O_2^{\cdot-}$ (8 à 20 μ M) mesurée en radiolyse pulsée dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6. Chaque valeur est une moyenne d'au minimum 3 cinétiques.

Les différentes traces aux longueurs d'ondes entre 500 et 700 nm et à différents pH sont modélisées de nouveau, cette fois avec une double exponentielle dans laquelle les valeurs de k_2 et k_3 sont fixées et correspondent à celles déterminées dans la Figure 70. L'absorbance de T_2 à une longueur d'onde donnée est déterminée par la valeur $A_3 - A_2$ (Figure 57).

Notons que le spectre du T_2 à pH 7.6 est peu fiable car, à ce pH, k_2 et k_3 sont très proches et il est difficile de modéliser correctement les différentes cinétiques. A ce pH et aux longueurs d'onde en dessous de 610 nm, ces deux cinétiques sont décroissantes. Les difficultés de la modélisation de deux cinétiques décroissantes, avec des constantes de vitesse proches sont présentées en annexe (cf. Annexe 5). Il est probable que tous les points d'absorbance calculés en dessous de 610 nm soient largement surestimés. A pH 6, pH 8.5 ou pH 9.5, la différence entre k_2 et k_3 étant plus grande, le spectre du T_2 peut être calculé avec plus de précision.

Le spectre du T_2 , comme le montre la Figure 71, est modifié selon le pH avec un maximum d'absorption qui oscille entre 560 et 650 nm (Figure 71). A pH acide le maximum d'absorption est à 650 nm, alors qu'à pH basique le maximum d'absorption est à 560 nm. Cette modification de spectre en fonction du pH a l'apparence d'un équilibre acido-basique qui rappelle la transition alcaline : $Fe^{3+}-OH \leftrightarrow Fe^{3+}-Glu$ décrit pour la SOR sauvage oxydée (Nivière et coll, 2004) ou celle : $Fe^{3+}-OH_2 \leftrightarrow Fe^{3+}-OH$ décrit pour le mutant E47A oxydé (Mathé et coll, 2005). La valeur du pKa pouvant être associée à cette modification de T_2 en

fonction du pH, n'est pas déterminable expérimentalement au vu de l'incertitude sur le spectre du T₂ à certains pH.

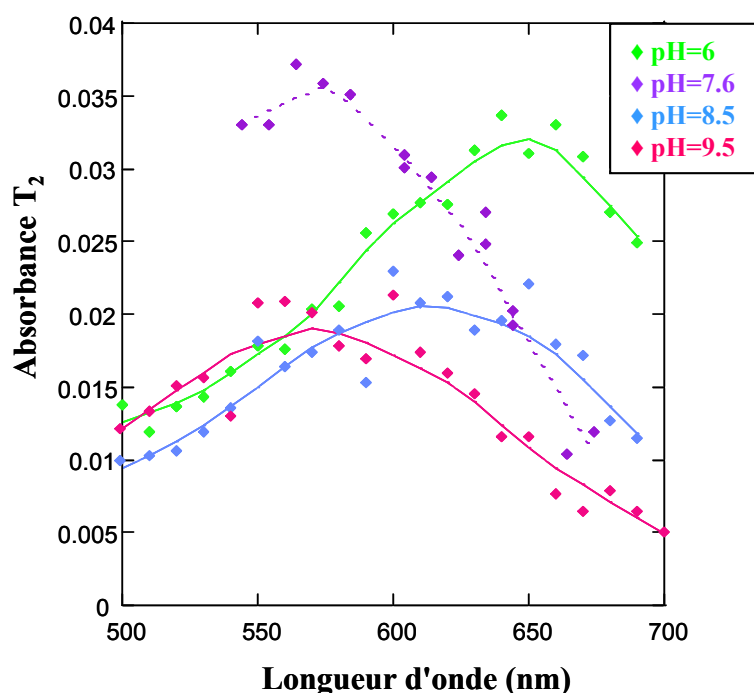


Figure 71 : Spectres du T₂ calculé à pH 6, pH 7.6, pH 8.5 et pH 9.5, pour la réaction de la SOR sauvage de *D. baarsii* (100 μM) dans 10 mM formiate, 2 mM tampon avec 8 μM de O₂^{•-}. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Nous verrons plus loin que le Glu 47 n'intervient pas au niveau de k_2 . Nous proposons donc que selon le pH, T₂ pourrait correspondre à une espèce Fe³⁺-OH en équilibre acido-basique avec une espèce Fe³⁺-OH₂, comme cela a été rapporté pour la SOR de *A. fulgidus* (Rodrigues et coll, 2007).

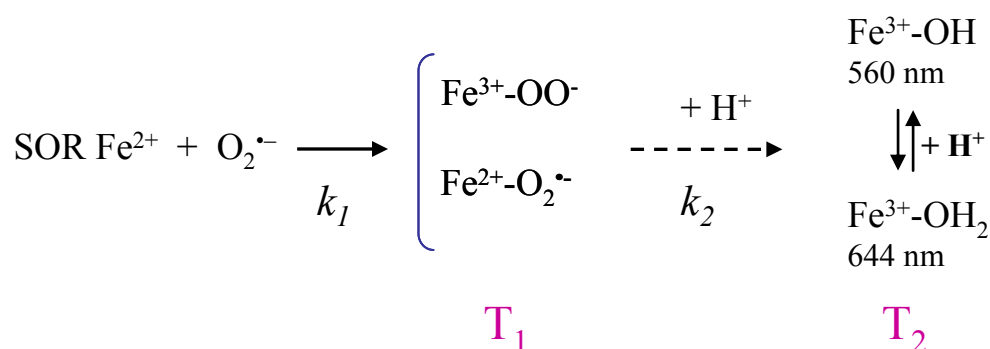


Figure 72 : Hypothèse sur la nature de T₂.

3 Formation des produits finaux de la réaction

Comme nous l'avons vu dans la partie sur l'effet photochimique, le spectre du T₃ est identique à celui de la SOR oxydée stœchiométriquement par le superoxyde à tous les pH étudiés (Figure 73).

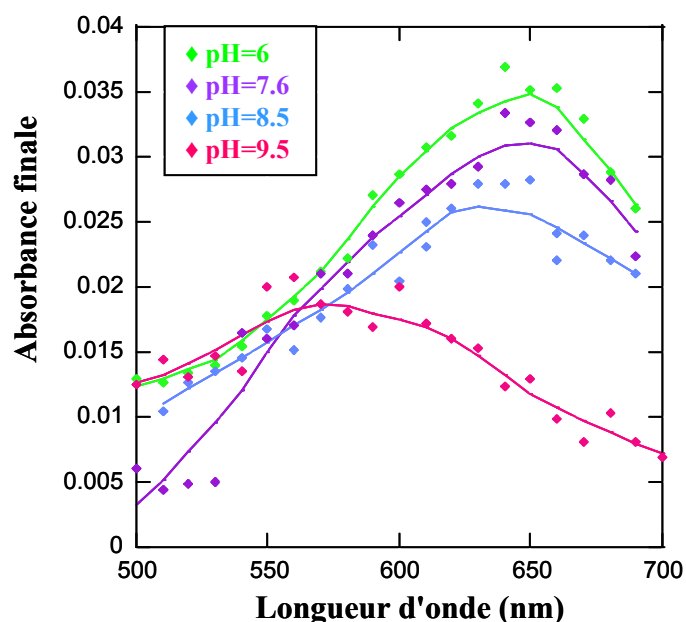


Figure 73 : Spectres de la SOR finale, 25 ms à 1 s après la réaction de la SOR WT de *D. baarsii* (100 μ M) avec 8 μ M de O₂^{•-} dans 10 mM de formiate, 2 mM de tampon à pH 6, pH 7.6, pH 8.5 et pH 9.5. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Les espèces finales oxydées de la SOR sauvage de *D. baarsii* ont été bien caractérisées. Le Glutamate 47 et l'anion HO⁻ sont en compétition pour occuper le sixième site de coordination du fer du site actif. Ce processus d'échange de ligand a l'apparence d'un équilibre acido-basique avec une valeur de pK_a de 9.0 entre les espèces Fe³⁺-Glu et Fe³⁺-OH (Nivière et coll, 2004). Les modifications observées sur le spectre du T₃ selon le pH (Figure 73) sont tout à fait compatibles avec cette valeur de pK_a de 9.

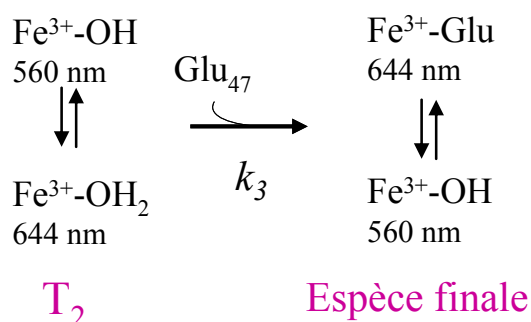


Figure 74 : Hypothèse sur l'évolution de T₂ en espèce finale.

La Figure 75 montre que la courbe représentant k_3 en fonction du pH est une sigmoïde avec un point d'inflexion à 7.2. La dépendance de $\log k_3$ au pH peut être modélisée par deux droites avec une cassure de pente à pH = 6.8 (Figure 75). Selon l'hypothèse de la Figure 74, ce pKa correspond au pKa de l'espèce T₂, la fixation du Glu 47 étant plus rapide sur la forme Fe³⁺-OH₂ que sur la forme Fe³⁺-OH. Cela est en accord avec le fait que le ligand H₂O peut être déplacé plus facilement par le carboxylate de E47 que par le ligand HO⁻.

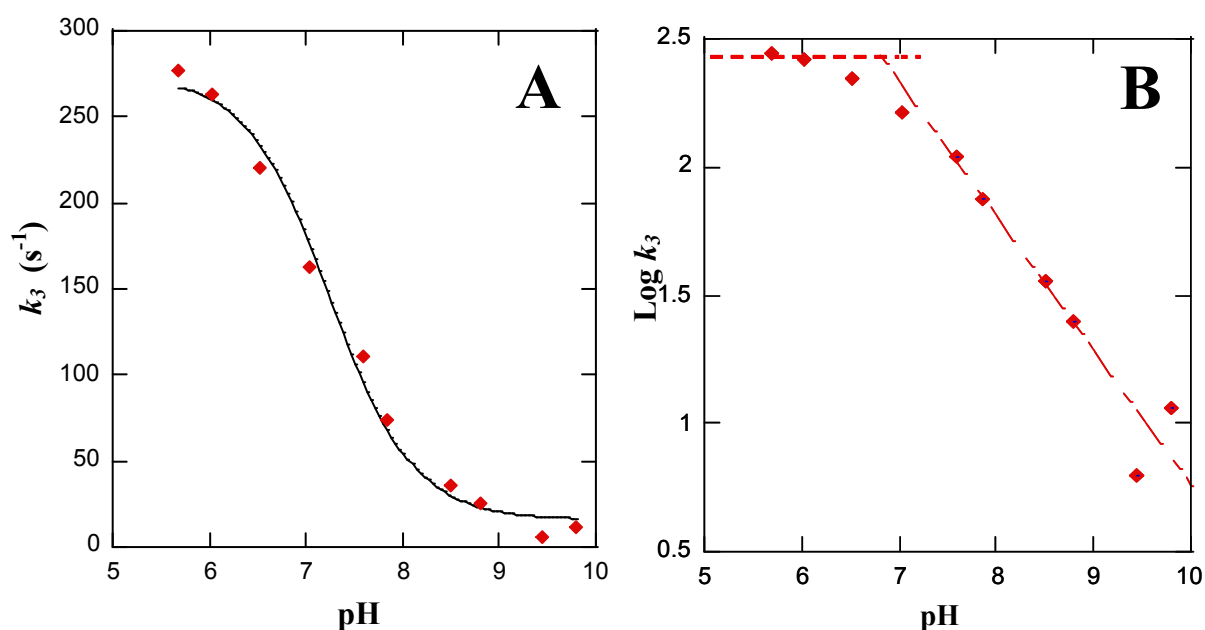


Figure 75 : Effet du pH sur k_3 , de la réaction de la SOR sauvage de *D. baarsii* (100 μM) avec 8 μM ou 12 μM de O₂⁻ dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. (A) Modélisation avec une sigmoïde, définissant un pKa : $k_3 = (A_2 + A_1 \times 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}) / (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})})$ avec pKa = 7.2 ± 0.1. (B) A pH > 7, $\log k_3$ est modélisable par l'équation $\log k_3 = 6.97 - 0.64 \times \text{pH}$. La cassure de pente est observée à pH 6.8.

2. Etude du mutant E47A

Afin de vérifier que k_3 décrit la fixation du Glutamate 47 sur le sixième site de coordination comme proposé Figure 74, l'effet de la mutation E47A sur le k_2 et le k_3 a été étudié. Les mêmes expériences de radiolyse pulsée que celles réalisées sur la SOR sauvage ont donc été répétées sur le mutant SOR E47A. Les cinétiques sont modélisables par une double exponentielle alors que celles obtenues avec la SOR sauvage étaient modélisable par une triple exponentielle.

La cinétique de formation du 1^{er} intermédiaire, décrite par k_1 , ainsi que son spectre d'absorption sont identiques à ceux observés avec la SOR sauvage à tous les pH entre 5 et 10. L'évolution de T_1 , décrite par k_2 , à tous les pH étudiés entre 5 et 10, est similaire de celle décrite pour la SOR sauvage (Figure 76). Le logarithme de k_2 présente une dépendance linéaire au pH lorsque $\text{pH} < 8$: $\log k_2 = \log(k_0) - 0.62 \times \text{pH}$ avec k_0 calculé à $7.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figure 76). Lorsque $\text{pH} < 8$, $\log k_2$ varie linéairement en fonction du pH, suggérant que comme pour la SOR sauvage la protonation se fait par H_3O^+ (Figure 76). Lorsque $\text{pH} > 8$, $\log k_2$ est indépendant du pH. Comme pour la SOR sauvage, à pH basique la protonation se fait par une molécule d'eau (Figure 76).

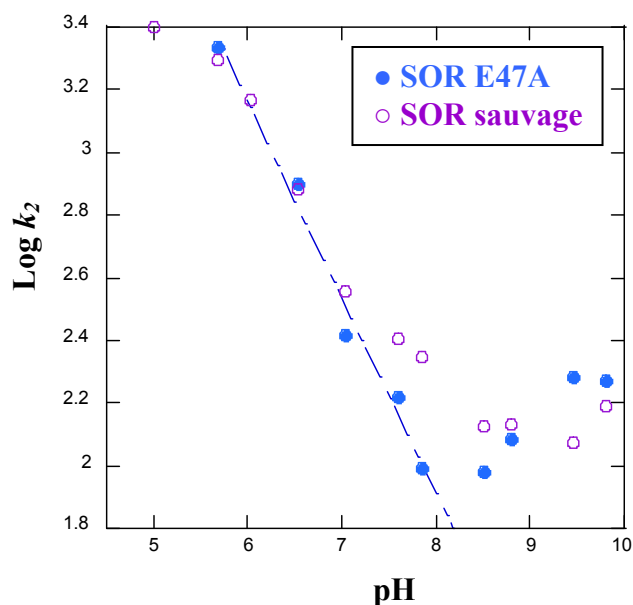


Figure 76 : Effet du pH sur la constante de vitesse k_2 pour la réaction de la SOR sauvage et du mutant E47A de *D. baarsii* (100 μM) avec 8 ou 12 μM de $\text{O}_2^{\cdot -}$ dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. A $\text{pH} < 8$, le logarithme de k_2 présente une dépendance linéaire au pH modélisable pour le mutant E47A par : $\log k_2 = 6.83 - 0.61 \times \text{pH}$.

Pour le mutant E47A, quelque soit le pH et la longueur d'onde considérée, l'étape correspondant à la constante de vitesse k_3 n'est plus observée. Le 2nd intermédiaire T_2 correspond donc à l'espèce finale pour ce mutant. Le spectre du T_2 se superpose parfaitement avec le spectre de la SOR E47A oxydée à tous les pH considérés (Figure 77). Le spectre du mutant E47A oxydé est un équilibre entre les espèces $Fe^{3+}-OH_2$ et $Fe^{3+}-OH$. Selon le pH le ligand sur la sixième position de coordination du fer est une molécule d'eau à pH acide ($Fe^{3+}-OH_2$) et ion HO^- à pH basique ($Fe^{3+}-OH$) (Mathé et coll, 2005).

Pour le mutant E47A, il est possible de déterminer le pKa du T_2 en radiolyse pulsée, en traçant $DO_{640nm} = f(pH)$. Les points sont modélisable par une sigmoïde présentant un point d'inflexion à $pH\ 6.7 \pm 0.2$ (Figure 77). Cette valeur correspond bien au pKa des espèces finales oxydées $Fe^{3+}-OH$ et $Fe^{3+}-OH_2$ du mutant E47A qui a été déterminé à 6.7 (Nivière et coll, 2004).

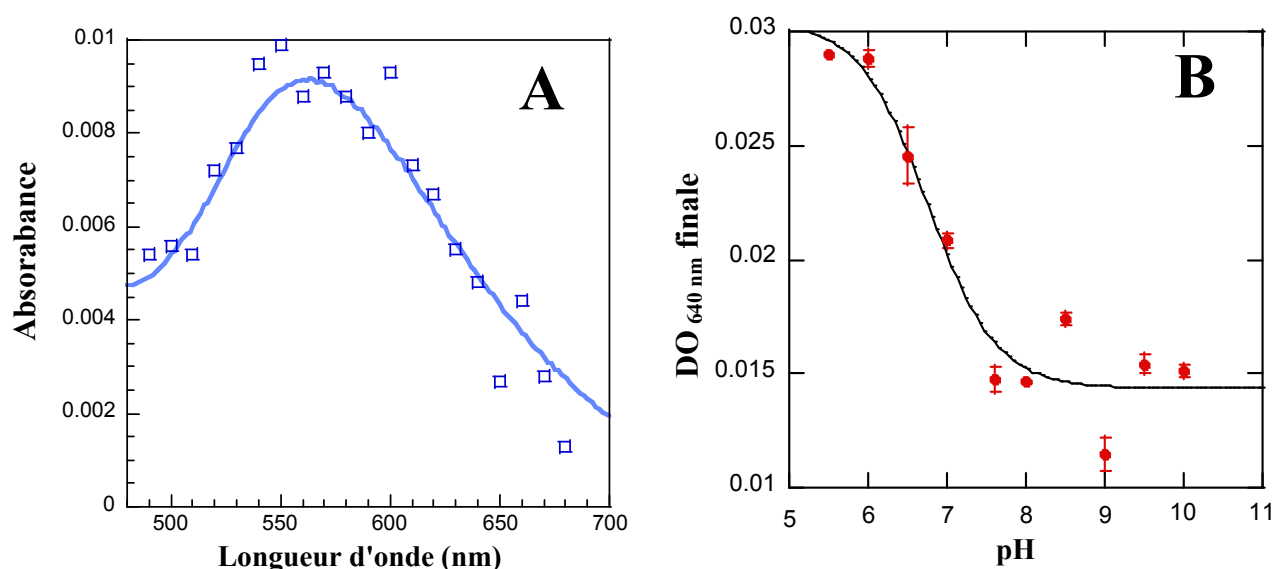


Figure 77 : (A) Spectre reconstitué de l'espèce finale (T_2) à 50 ms pour la réaction de la SOR E47A (100 μM) de *D. baarsii* avec 3 μM de $O_2^{\cdot -}$ en présence de 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 8.5. La ligne pleine correspond au spectre d'absorption de 9 μM de la SOR E47A (100 μM) oxydée à pH 8.5 par K_2IrCl_6 ; (B) DO finale à 640 nm de la réaction de la SOR E47A (100 μM) avec 8 μM de $O_2^{\cdot -}$ en fonction du pH, dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. Les points sont modélisés par l'équation définissant une sigmoïde $pKa\ DO = (A_2 + A_1 \times 10^{(pH-pKa)}) / (1 + 10^{(pH-pKa)})$ avec $pKa = 6.7 \pm 0.2$. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Nous remarquons que la dépendance au pH des constantes k_2 pour la SOR sauvage et pour le mutant E47A est identique. Cela suggère fortement qu'elles correspondent à la même étape (Figure 76). Ainsi ces résultats supportent le fait que l'espèce T_2 formée au cours de la réaction de la SOR sauvage avec $O_2^{\cdot -}$ correspond à un équilibre entre les espèces $Fe^{3+}-OH_2$ et $Fe^{3+}-OH$.

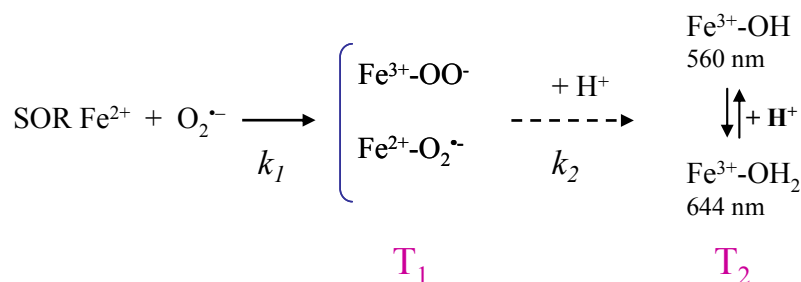


Figure 78 : Schéma réactionnel de la SOR sauvage et du mutant E47A avec le superoxyde.

3. Dosage de H₂O₂ après réaction de la SOR avec O₂^{•-}

La SOR catalyse la réduction du superoxyde en H₂O₂. La quantité de H₂O₂ formée au cours de la réduction de superoxyde par la SOR E47A a été étudiée afin d'identifier si la molécule de H₂O₂ est relarguée avant ou après la formation du T₂. La radiolyse continue permet de former du superoxyde à vitesse constante durant tout le temps de l'irradiation. Cette technique est donc bien adaptée pour analyser les produits finaux de la réaction de la SOR avec le superoxyde. Les expériences de radiolyse continue sont réalisées en utilisant une source de cobalt-60 avec un débit dose pour l'irradiation de 4 Gy·min⁻¹. La solution de SOR (40 μM) est dans 2 mM Tris/HCl à pH 7.6, 10 mM formiate de sodium et saturé en O₂ à température ambiante. La durée de l'irradiation étant de 7 min (40 Gy), 23 μM de superoxyde sont donc produits ($G = 0.62 \mu\text{mol J}^{-1}$). Immédiatement après l'irradiation, un spectre UV-visible de la solution est réalisé, en parallèle avec la même solution non irradiée. Cela permet de soustraire la légère auto-oxydation du site actif de la SOR en présence de 100 % de O₂. H₂O₂ produit est dosé immédiatement après l'irradiation par la méthode HRP/LCV. La radiolyse de l'eau conduit également à la formation de H₂O₂, appelé H₂O₂ radiolytique, la dose d'irradiation utilisée dans nos expériences (40 Gy) conduit à la formation de 2.6 μM de H₂O₂ radiolytique ($G \approx 0.07 \mu\text{mol J}^{-1}$).

Pour la SOR sauvage, autant de molécule de H₂O₂ sont produite que de SOR oxydées au cours de la réaction. Cependant, nous savons que H₂O₂ peut réagir avec la SOR et l'oxyder. La somme de [H₂O₂] et [SOR_{ox}] dosées à la fin de la réaction est comparée à celle théoriquement attendue pour une oxydation stoechiométrique de la SOR par O₂^{•-}. Les résultats obtenus avec le mutant E47A sont comparés à ceux de la SOR sauvage (Figure 79).

SOR	pH	[H ₂ O ₂] finale† (μM)	[H ₂ O ₂] corr‡ (μM)	[SOR] oxydée* (μM)	[H ₂ O ₂]+[SOR] dosée (μM)	[H ₂ O ₂]+[SOR] attendue (μM)
WT	6	12 ± 1	9	40	49	46
	8.5	12 ± 1	9	30	39	46
E47A	6	13 ± 2	10	29	39	46
	8.5	11 ± 2	8	23	31	46

Figure 79 : Détermination des produits finaux de la réaction de la SOR sauvage ou E47A (40 μM) avec le superoxyde (23 μM) à pH 6 et 8.5 en radiolyse continue de débit dose 4 Gy·min⁻¹, en présence de 10 mM formiate et 2 mM tampon. Chaque point est une moyenne sur au minimum 3 points.

† Dosée par un dosage HRP/LCV.

‡ Corrigée du H₂O₂ radiolytique de 2.6 μM.

* Déterminée d'après le spectre UV-visible en utilisant ε à 644 nm.

Ces résultats montrent que la molécule de H₂O₂, formée au cours de la réaction de la SOR avec O₂^{•-}, est libérée avant la formation du 2nd intermédiaire et donc avant la fixation du Glu 47. Le Glutamate ne participe donc pas à la libération de H₂O₂, comme cela a été suggéré (Nivière et coll, 2004).

4. Nouveau mécanisme en absence d'effet photochimique

L'ensemble des données présentées ci-dessus, obtenues sur la SOR sauvage et le mutant E47A de *D. baarsii* nous permettent de proposer un mécanisme réactionnel pour la réaction de la SOR avec le superoxyde (Figure 80) en absence d'effet photochimique.

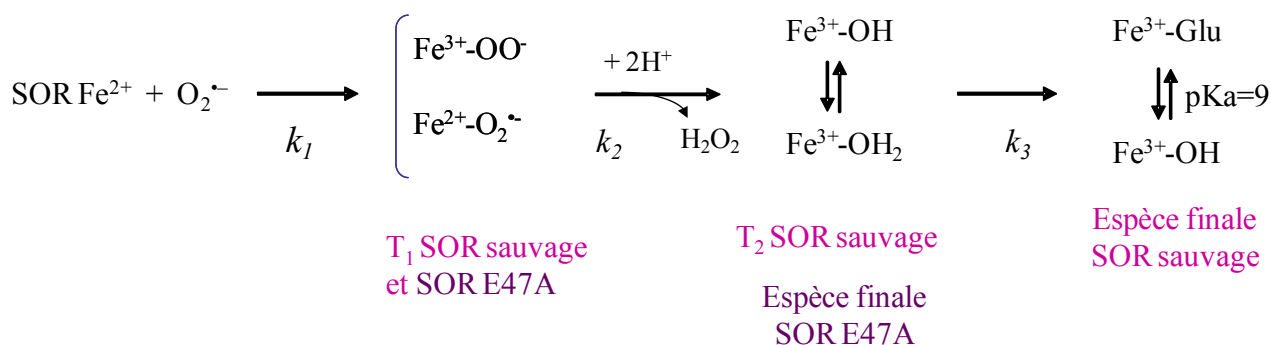


Figure 80 : Schéma du nouveau mécanisme de la SOR de *D. baarsii*.

En absence de l'effet photochimique, l'analyse de la réaction de la SOR sauvage de *D. baarsii* et de son mutant E47A, avec le superoxyde révèle toujours la présence de deux intermédiaires réactionnels T₁ et T₂, mais leurs spectres d'absorption UV-visible et leurs constantes de vitesse de disparition sont différents de ceux décrits précédemment en présence

de l'effet photochimique (Nivière et coll, 2004). Le produit final de la réaction, la SOR oxydée, peut être à présent observée par radiolyse pulsée, et correspond à l'évolution de T_2 .

Le second intermédiaire (T_2) représente un équilibre acido-basique entre les espèces $Fe^{3+}-OH$ et $Fe^{3+}-OH_2$. Plusieurs résultats nous permettent de le proposer. i) Le spectre du T_2 de la SOR sauvage varie en fonction du pH, avec un maximum d'absorption à 560 nm à pH basique et un maximum d'absorption à 650 nm à pH acide (Figure 71). ii) Le mutant E47A réagit avec le superoxyde de manière identique à la SOR sauvage, sauf que T_2 est le produit final de la réaction, la 3^{ème} cinétique (décrite par k_3) n'est plus observée. Le spectre du T_2 pour le mutant E47A correspond sans ambiguïté à l'équilibre acido-basique des espèces $Fe^{3+}-OH$ et $Fe^{3+}-OH_2$, bien caractérisé sur la forme oxydée de ce mutant (Nivière et coll, 2004). iii) La dépendance de k_3 au pH, a permis dans le cas de la SOR sauvage, de déterminer la valeur du pKa associé à un équilibre acido-basique du T_2 . Cette valeur est identique à celle déterminée pour les espèces $Fe^{3+}-OH$ et $Fe^{3+}-OH_2$ du mutant E47A (Figure 77 B).

Ainsi T_2 correspond à un équilibre acido-basique entre les espèces $Fe^{3+}-OH$ et $Fe^{3+}-OH_2$ de la SOR. L'évolution du T_2 , décrit par k_3 , correspond donc à la fixation du Glutamate 47 sur le sixième site de coordination du fer.

Selon ce schéma réactionnel, il faut noter que la fixation du Glutamate 47 sur le sixième site de liaison du fer, décrit par k_3 , ne peut pas correspondre à l'étape de libération de H_2O_2 , produit de la réduction de $O_2^{\bullet-}$ par la SOR. En effet, la quantité de H_2O_2 produit par mutant E47A est similaire à celle de la SOR sauvage. Cela implique que la libération de H_2O_2 se fait avant l'étape de fixation du glutamate (correspondant à k_3). C'est-à-dire que la libération de H_2O_2 se fait en parallèle de la formation du T_2 .

La formation de H_2O_2 à partir de $O_2^{\bullet-}$ nécessite un électron, mais aussi deux protons. Dans les expériences de radiolyse pulsée, seule l'étape décrivant la formation du T_2 (correspondant à k_2) peut être directement associée à un processus de protonation, car ce processus est cinétiquement limitant donc observable. Un second processus de protonation, non cinétiquement limitant, doit donc se produire entre le moment où la SOR réagit avec $O_2^{\bullet-}$ et où T_2 se forme, afin que H_2O_2 puisse être produit.

Nos données expérimentales sur la réactivité de la SOR de *D. baarsii* avec $O_2^{\bullet-}$ apparaissent à présent très similaires de celles rapportées pour les deux enzymes de *A. fulgidus*, avec la formation d'un intermédiaire T_2 associé à l'espèce $Fe^{3+}-OH$ (Rodrigues et coll, 2006 ; Rodrigues et coll, 2007). Nous pouvons noter qu'à pH 7.6, pour les deux enzymes

de *A. fulgidus*, les valeurs de k_2 et k_3 sont assez différentes (3800 et 25 s⁻¹) alors que chez *D. baarsii*, elles sont très proches (255 et 110 s⁻¹). Dans le cas de la SOR de *D. vulgaris*, qui a une forte homologie de séquence avec celle de *D. baarsii*, le second intermédiaire T₂ n'a pas observé et T₁ semble directement converti en l'espèce finale, SOR Fe³⁺-Glu (Emerson et coll, 2002). Il est possible que dans le cas de cette enzyme, le second intermédiaire T₂ existe aussi mais avec un k_3 plus élevé que le k_2 . Dans ce cas, l'étape décrite par k_2 sera cinétiquement limitante et T₂ non détectable. Il est donc concevable que la SOR de *D. vulgaris* possède un mécanisme réactionnel similaire à celui décrit pour les SORs de *A. fulgidus* et *D. baarsii*.

D. Etude du mutant E114A

Le Glutamate 114 interagit avec la cystéine du site actif par liaison de type dipolaire. Il a été montré que ce résidu permet une modulation fine de la force de liaison Fe-SCys du site actif. La mutation E114A entraîne un affaiblissement de la force de la liaison cystéine-fer (S-Fe). La réactivité de ce mutant avec O₂^{•-} a été étudiée précédemment par la radiolyse pulsée, en présence d'un filtre à 310 nm (Mathé et coll, 2007). Dans ces conditions, le spectre du second intermédiaire présente, comme pour la SOR sauvage, une bande fine à 625 nm, suggérant fortement la présence d'un effet photochimique. Nous avons donc repris les études de la réactivité du mutant E114A avec O₂^{•-} par radiolyse pulsée en absence de tout effet photochimique, en utilisant un filtre à 425 nm. Comme pour la SOR sauvage, en absence d'effet photochimique le mutant E114A présente des cinétiques de réduction de O₂^{•-} modélisables par trois exponentielles, correspondant à la formation de trois espèces différentes au cours du cycle catalytique.

Nos études de radiolyse pulsée montrent que la cinétique de formation de T₁ est inchangée par la mutation E114A. La cinétique de formation et le spectre du 1^{er} intermédiaire sont identiques à ceux observés pour la SOR sauvage, à tous les pH entre 5 et 10. De plus, les spectres UV-visible des différents intermédiaires reconstitués sont identiques à ceux obtenus avec la SOR sauvage. L'extrapolation du spectre T₂ du mutant E114A, réalisée de la même façon que précédemment (cf. Chapitre IV Partie II.C), donne également un spectre très similaire à celui de la SOR sauvage. Ces résultats montrent que la mutation E114A ne modifie pas le schéma réactionnel global de la SOR avec O₂^{•-} (Figure 80). E114A réagit avec le superoxyde pour donner un intermédiaire T₁ de type Fe³⁺-OO⁻ ou Fe²⁺-OO^{•-}, qui est ensuite protoné pour donner une espèce Fe³⁺-OH en équilibre acide-base avec une espèce Fe³⁺-OH₂. Enfin, dans

une dernière étape, le ligand hydroxyle/aqua est déplacé par le groupement carboxylate du E47 pour donner l'espèce finale $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}_{47}$ en équilibre acide-base avec une espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$.

Cependant, nous avons observé que la mutation E114A ralentit spécifiquement les cinétiques de formation du second intermédiaire T_2 (décrite par k_2) et de l'espèce finale oxydée (décrite par k_3) et ceci à tous les pH (Figure 81 et Figure 82). De manière remarquable, bien que ralenties, k_2 et k_3 pour le mutant E114A gardent une dépendance au pH très similaire à celle observée pour la SOR sauvage (Figure 81 et Figure 82).

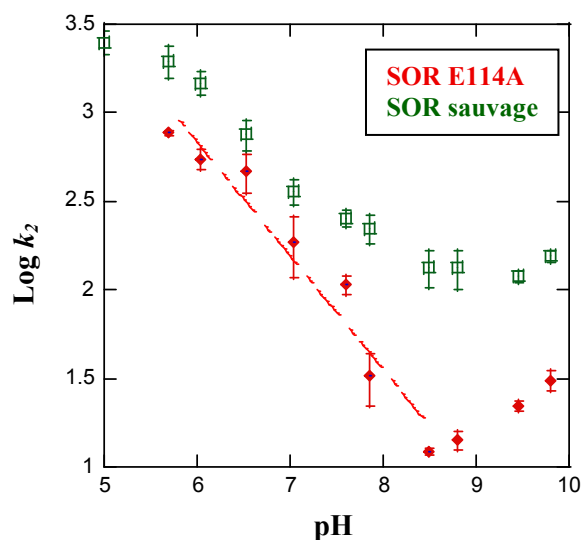


Figure 81 : Effet pH observé sur la constante de vitesse k_2 de la réaction de la SOR sauvage et le mutant E114A (100 μM) de *D. baarsii* avec 8 μM ou 12 μM de $\text{O}_2^{\bullet-}$ dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. A pH < 8.5, le logarithme de k_2 pour la SOR E114A présente une dépendance linéaire au pH : $\log k_2 = \log(k_0) - (0.64 \pm 0.07) \times \text{pH}$ avec $\log k_0 = 6.7 \pm 0.5$.

Pour le mutant E114A, le logarithme de k_2 présente une dépendance linéaire au pH lorsque pH < 8.5 : $\log k_2 = \log(k_{\text{pH}0}) - 0.64 \times \text{pH}$ où $k_{\text{pH}0}$, avec une valeur calculée de $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, est la constante de vitesse lorsque le pH approche zéro (Figure 76). Ces données montrent que comme pour la SOR sauvage, k_2 correspond à un processus de protonation par H_3O^+ . Lorsque pH > 8, le log k_2 est indépendant du pH, la protonation se fait donc par une molécule d' H_2O , comme pour la SOR sauvage (Figure 76). Notons que k_2 augmente légèrement avec le pH lorsque pH > 8.5.

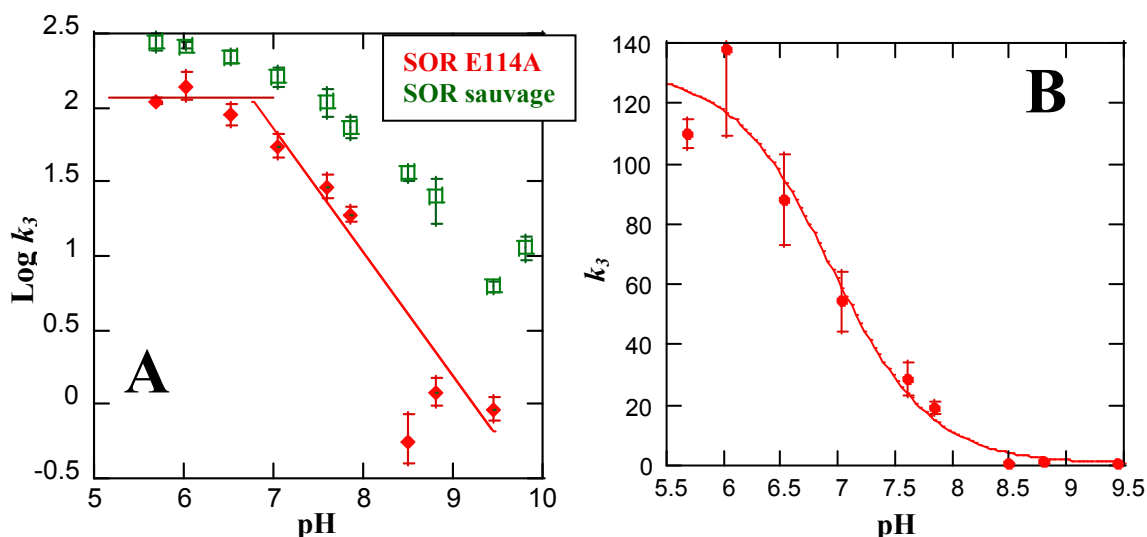


Figure 82 : Effet du pH observé sur la constante de vitesse k_3 de la réaction de la SOR sauvage et du mutant E114A (100 μM) de *D. baarsii* avec 8 μM ou 12 μM de $\text{O}_2^{\bullet-}$ dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. (A) La sigmoïde est modélisée par l'équation définissant un pK_a : $k_3 = (A_2 + A_1 \times 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}) / (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)})$ avec $\text{pK}_a = 6.94 \pm 0.16$; (B) A $\text{pH} > 7$, $\log k_3$ est modélisable par $\log k_3 = 7.68 - 0.83 \times \text{pH}$. La cassure de pente est observée à $\text{pH} \approx 6.8$.

De nouveau, comme pour la SOR sauvage, k_3 présente une dépendance au pH correspondant au pK_a du T_2 . La valeur du pK_a du T_2 de E114A est mesurée à une valeur de 6.9 ± 0.2 proche de celles déterminées pour le mutant SOR E47A (6.7) et pour la SOR sauvage (7). Ce pK_a correspond à l'équilibre acido-basique des espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ et $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$.

De nouveau comme pour k_2 , la constante de vitesse k_3 est fortement diminuée de manière similaire à tous les pH étudiés (Figure 82). Ainsi, la cinétique de disparition du T_2 (décrite par k_3) dans le mutant E114A est ralentie mais le pK_a associé à T_2 ne semble pas modifié par la mutation.

En conclusion, en absence d'effet photochimique, l'effet de la mutation E114A est d'une part, de ralentir la cinétique de protonation de T_1 et d'autre part, de ralentir la cinétique de fixation du carboxylate de E47 sur l'intermédiaire T_2 pour former le produit final de la réaction SOR $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$. Ces résultats confirment les conclusions tirées des études de la réaction du E114A avec $\text{O}_2^{\bullet-}$, en présence de l'effet photochimique (Mathé et coll, 2007). Ce travail suggérerait qu'en affaiblissant la liaison S-Fe du site actif, la mutation E114A rendait l'intermédiaire T_1 fer-peroxo plus acide et donc plus difficilement protonable. Ici, nous observons qu'en absence de l'effet photochimique, la mutation E114A ralentit fortement la cinétique de protonation de T_1 (décrite par k_2). Cette mutation induit bien une acidification de l'intermédiaire fer-peroxo.

Par ailleurs, en absence d'effet photochimique, l'évolution du T₂ vers le produit final de la réaction est à présent observable (décrite par k_3). Le mutant E114A a pour effet de ralentir le k_3 , c'est-à-dire qu'il ralentit la cinétique de fixation du carboxylate du E47 sur le T₂. Cela va de nouveau dans le sens de l'affaiblissement de la liaison S-Fe. Par cette mutation, l'échange du ligand OH du T₂ avec le carboxylate du Glu 47 est rendu plus difficile.

E. Conclusion

L'ensemble des données présentées ci-dessus, obtenues sur la SOR sauvage et les mutants E47A et E114A de *D. baarsii* nous permet de proposer un mécanisme réactionnel pour la réaction de la SOR avec le superoxyde (Figure 83).

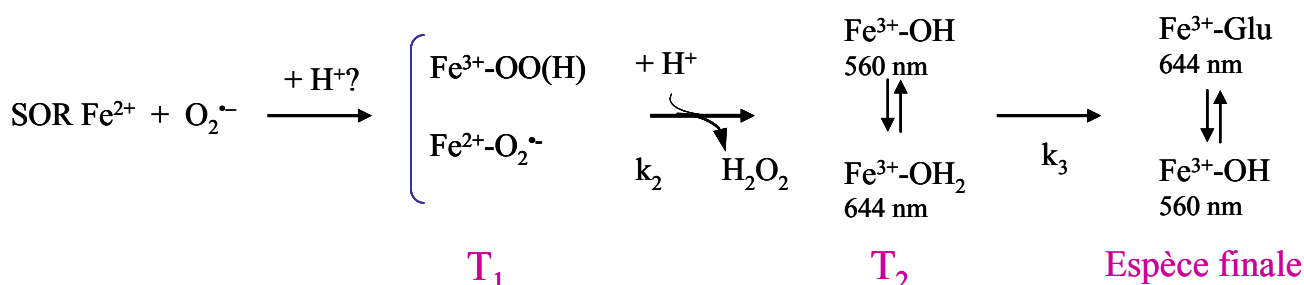


Figure 83 : Schéma du mécanisme de la SOR de *D. baarsii*.

En absence de l'effet photochimique, l'analyse de la réaction de la SOR sauvage de *D. baarsii* et de son mutant E114A, avec le superoxyde révèle toujours la présence de deux intermédiaires réactionnels T₁ et T₂, mais leurs spectres d'absorption UV-visible et leurs constantes de vitesse de formation sont différents de ceux décrits précédemment en présence de l'effet photochimique. Le produit final de la réaction, la SOR oxydée, peut être à présent observé par radiolyse pulsée, et correspond à la fixation du E47 sur T₂.

Notons cependant que selon le schéma proposé, si le T₁ n'est pas protoné, l'étape de transformation de T₁ en T₂ est associée à un processus de double protonation. Etant donné que nous avons montré que le k_2 correspond à une cinétique faisant intervenir un seul proton, ceci implique qu'un second processus de protonation cinétiquement non limitant et donc non observé doit exister. Les études développées dans la suite sur le mutant K48I vont dans le sens de l'existence d'un second processus de protonation très rapide.

Pour conclure, l'étude du mécanisme de la SOR *D. baarsii* en absence d'effet photochimique révèle la formation d'un second intermédiaire réactionnel très similaire à celui rapporté pour la SOR de *A. fulgidus* (Rodrigues et coll, 2006). Ces données suggèrent que les mécanismes enzymatiques des différentes SORs sont au final très similaires. Cela est en accord avec la forte homologie de séquence et de structure de leurs sites actifs.

III. Effets de la mutation K48I étudiés par radiolyse pulsée

Comme cela a été décrit dans l'introduction, les structures obtenues par diffraction aux RX des espèces de types $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, formées lors de la réaction du mutant E114A avec H_2O_2 (Katona et coll, 2007), mettent en évidence un rôle primordial de la Lysine 48 dans la réduction du superoxyde par la SOR. D'après ces structures, la lysine 48 permet de positionner une molécule de H_2O , via un étroit réseau de liaisons hydrogène, à proximité de l'oxygène proximal de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. Ce positionnement est optimal pour permettre la protonation de l'oxygène proximal de $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ par cette molécule d'eau et la libération de H_2O_2 . Notons que jusqu'à présent, ce rôle proposé pour la Lys 48 est basé uniquement sur ces structures RX. A ce jour aucune donnée cinétique n'a permis de mettre en évidence un tel rôle pour la lysine 48 au cours du cycle d'oxydation de la SOR par le superoxyde.

Afin de préciser ce rôle possible de la lysine 48 dans la catalyse, la réaction de la SOR K48I avec le superoxyde a été étudiée par radiolyse pulsée, dans les mêmes conditions que pour la SOR sauvage, c'est-à-dire en absence de tout effet photochimique.

A. Formation du 1^{er} intermédiaire réactionnel

La Lysine 48 est le résidu chargé positivement le plus proche du site actif. A pH physiologique, elle se trouve sous forme protonée ($\text{pK}_a = 10.7$). Sa mutation en isoleucine ou en alanine entraîne un fort ralentissement de la réactivité de la SOR avec le superoxyde. La constante de vitesse de formation du 1^{er} intermédiaire est diminuée d'un facteur 30 pour la SOR de *D. baarsii* (Lombard et coll, 2001). Il a été proposé que cette lysine chargée positivement joue un rôle d'attracteur électrostatique pour l'anion superoxyde (Lombard et coll, 2001 ; Emerson et coll, 2002).

Les études de radiolyse pulsée publiées à ce jour sur la SOR K48I de *D. baarsii* ont été réalisées avec un filtre coupant les longueurs d'onde en dessous de 310 nm. Dans ces études, l'effet photochimique caractérisé par l'apparition d'une bande fine à 625 nm sur le second intermédiaire réactionnel est clairement présent (Nivière et coll, 2004). Nous avons donc répété ces expériences de radiolyse pulsée sur ce mutant en absence de tout effet photochimique, avec un filtre à 425 nm.

La présence d'un filtre à 425 nm ne modifie pas la cinétique de formation du premier intermédiaire réactionnel T_1 . La constante de vitesse k_1 de formation du T_1 est de $4.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit une valeur 30 fois plus faible que celle de la SOR sauvage, comme cela a été rapporté précédemment (Lombard et coll, 2001). La vitesse de formation de T_1 est pH indépendant et est proportionnelle à $[\text{SOR}]$ et à $[\text{O}_2^{\cdot-}]$ (Figure 84). Cette réaction est donc toujours une réaction du second ordre entre la SOR et le superoxyde avec une constante de vitesse k_1 égale à $4.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

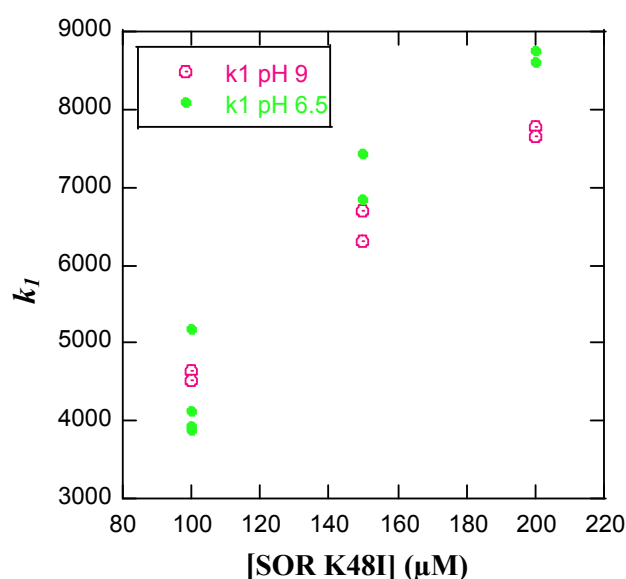


Figure 84 : Effet de $[\text{SOR}]$ et du pH sur la constante de vitesse k_1 de réaction du mutant K48I de *D. baarsii* avec $8 \mu\text{M}$ de $\text{O}_2^{\cdot-}$, déterminé par radiolyse pulsée dans 10 mM formiate, 2 mM tampon.

Le spectre d'absorption de T_1 pour le mutant K48I est légèrement différent de celui obtenu avec la SOR sauvage. En effet, comme le montre la Figure 85, bien qu'il possède toujours une bande d'absorption large centrée à 600 nm, son maximum d'absorption est 1.3 fois plus faible que celui de la SOR sauvage (Figure 85). Ce spectre UV-Visible est identique quelque soit le pH.

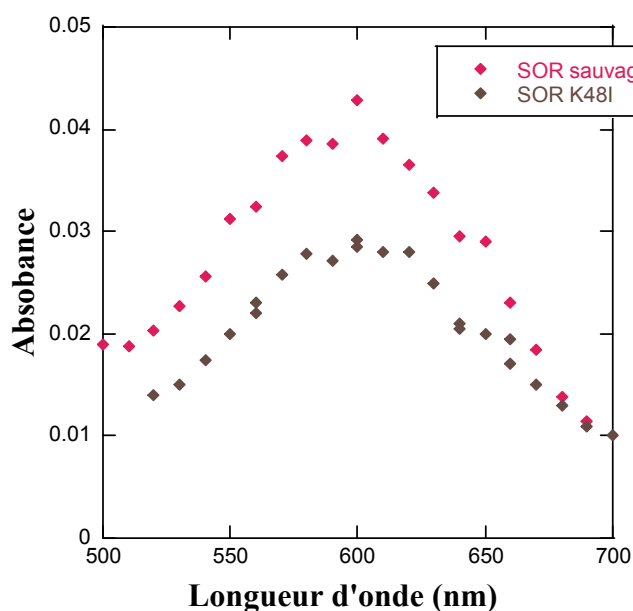


Figure 85 : Spectres de T_1 des SORs de *D. baarsii* (100 μ M) sauvage (rose) et K48I (marron), reconstitués en radiolyse pulsée 100 μ s et 2 ms respectivement, après le début de la réaction avec 8 μ M de $O_2^{\bullet-}$ dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl à pH 8.5. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

La valeur de l'épsilon du T_1 pour le mutant K48I est de 2.0 $M^{-1}.cm^{-1}$ contre 2.5 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour le T_1 de la SOR sauvage. Notons que cette valeur d'épsilon du T_1 plus faible pour le mutant K48I ne correspond pas à une réaction incomplète du mutant avec $O_2^{\bullet-}$. En effet, cette réaction est bimoléculaire ($SOR + O_2^{\bullet-}$) avec une constante de vitesse k_I de $4.2 \times 10^7 M^{-1}.s^{-1}$, 100 fois supérieure à la dismutation spontanée du superoxyde ($3 \times 10^5 M^{-1}.s^{-1}$ à pH 7.4).

B. Formation des produits de la réaction avec $O_2^{\bullet-}$

L'évolution du T_1 dans le cas du mutant K48I est différente de celle observée pour la SOR sauvage. T_1 évolue en quelques dizaines de millisecondes vers une espèce dont l'absorbance entre 500 et 700 nm est d'autant plus faible que le pH est basique, jusqu'à atteindre des valeurs pratiquement nulles à pH > 8.5 (Figure 86).

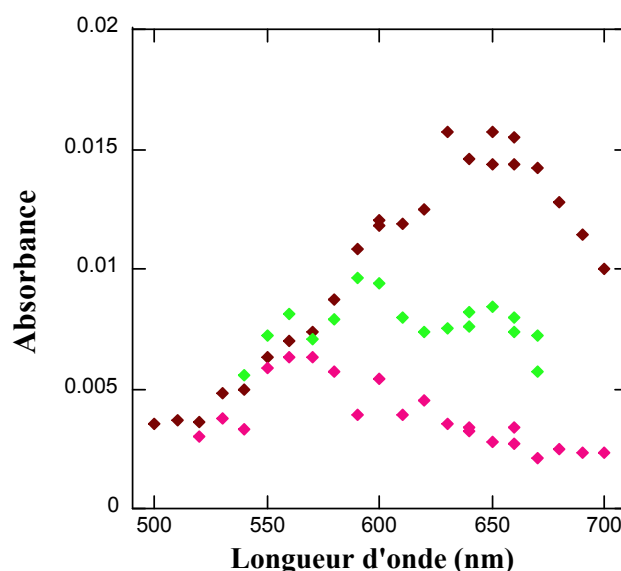


Figure 86 : Spectres d'absorption des espèces finales à pH 5.6 (**marron**), pH 7.6 (**vert**) et pH 8.5 (**rose**) observés 20 ms (pH 5.6) et 500 ms (pH 7.6 et 8.5) après la réaction de la SOR K48I de *D. baarsii* (100 μM) avec 8 μM de $\text{O}_2^{\cdot -}$ dans 10 mM formiate, 2 mM tampon. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Afin de déterminer à quelles espèces correspondent ces spectres obtenus après la réaction du mutant K48I avec le superoxyde (Figure 86) et de déterminer si H_2O_2 est toujours produit, les expériences suivantes ont été réalisées :

- 15 μM du mutant K48I ont réagi avec 12 μM de superoxyde généré par radiolyse pulsée (impulsion de 18.5 Gy). L'expérience est réalisée dans 10 mM formiate et 2 mM bis Tris/HCl à pH 7.0 d'une part et dans 10 mM formiate et 2 mM glycine/NaOH pH 9.0 d'autre part. De la catalase est présente dans milieu réactionnel (500 unités/mL) de manière à éviter toute réaction supplémentaire avec H_2O_2 formé. Chaque expérience est doublée. Un spectre d'absorption UV-visible est enregistré une minute après l'impulsion, par un spectrophotomètre classique. Dans tous les cas, les spectres obtenus sont identiques à ceux de la Figure 86. Ces données montrent que les spectres reconstitués de la Figure 86 sont bien les espèces finales de la réaction. Les résultats sont présentés dans le tableau de la Figure 87.

- Dans une autre expérience, le superoxyde est généré par radiolyse continue. La radiolyse continue est réalisée en utilisant une source de cobalt-60 de rendement radiolytique de $6 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$. La solution de SOR (40 μM) est dans 2 mM de tampon, 10 mM formiate de sodium et saturé en O_2 à pH 5.4, 7.0 et 9.0 et à température ambiante. La durée de l'irradiation est de 10 min (60 Gy), produisant 35 μM de superoxyde ($G = 0.62 \mu\text{mol J}^{-1}$). Immédiatement après l'irradiation, un spectre UV-visible de la solution est réalisé et la quantité de SOR K48I oxydée est mesurée. Les résultats sont présentés dans le tableau de la Figure 87.

A la fin de chacune de ces deux séries d'expériences, la solution protéique est oxydée par ajout de chlorure d'iridium. Nous pouvons en déduire la proportion de SOR réduite en fin de réaction pour chaque pH. Dans tous les cas, les spectres correspondent à la SOR oxydée, en quantité identique à celle de la SOR présente au début de l'expérience. Ces données montrent que les faibles bandes d'absorbance observées après la réaction avec $O_2^{\bullet-}$ correspondent à un mélange de SOR réduite et oxydée dans différentes proportions selon le pH.

Les résultats de ces expériences sont présentés ci-dessous :

Radiolyse pulsée (spectre reconstitué):

réaction de 100 μM de SOR K48I avec 8 μM de $O_2^{\bullet-}$

pH	tampon	[SOR _{ox}] (μM)	[SOR _{red}] (μM)	% [K48I _{ox}]/[O ₂ ^{•-} généré]
pH 5.6	Mes	3.2	nd	40%
pH 7.6	Tris/HCl	2.4	nd	32%
pH 8.5	Glycine/NaOH	1.3	nd	17%

Spectre UV visible après radiolyse pulsée ^a:

réaction de 15 μM de SOR K48I avec 12 μM de $O_2^{\bullet-}$

pH	tampon	[SOR _{ox}] (μM)	[SOR _{red}] (μM)	% [K48I _{ox}]/[O ₂ ^{•-} généré]
pH 7	bis Tris/HCl	4.1	11	34%
pH 9	Glycine/NaOH	1.3	14	10%

Spectre UV visible après radiolyse continue ^a:

réaction de 100 μM de SOR K48I avec 35 μM de $O_2^{\bullet-}$

pH	tampon	[SOR _{ox}] (μM)	[SOR _{red}] (μM)	% [K48I _{ox}]/[O ₂ ^{•-} généré]
pH 5.5	Mes	14	86	40%
pH 7	phosphate	15	86	40%
pH 7	bis Tris/HCl	5	90	15%
pH 9	Glycine/NaOH	6.5	90	18%

Figure 87 : Proportion de SOR K48I oxydée en fin de réaction avec le superoxyde par rapport à celle attendue pour une réaction stoechiométrique (^a expériences réalisées en double, en présence de 500 U/mL de catalase) en présence de 10 mM de formiate et 2 mM tampon. nd : non déterminé.

Ces expériences montrent que les absorbances très faibles obtenues après la réaction du mutant K48I avec $O_2^{\bullet-}$ en radiolyse pulsée ne sont pas dues à une destruction du site actif de l'enzyme car toute la SOR est retrouvée intègre en fin de réaction. De plus, elle a gardé ses propriétés redox car elle peut être réduite et oxydée par ajout d'ascorbate et de chlorure d'iridium, respectivement. Ces données démontrent, qu'en fin de réaction avec $O_2^{\bullet-}$, la SOR K48I se trouve majoritairement sous forme réduite Fe^{2+} et ceci d'autant plus que la réaction se fait à pH basique.

♦ Quantité de H_2O_2 formé après réaction de la SOR K48I avec $O_2^{\bullet-}$, à différents pH

Afin de déterminer la quantité de H_2O_2 formé après réaction du mutant K48I avec $O_2^{\bullet-}$, 20 μM de SOR K48I sont mis à réagir avec 16.5 μM de superoxyde généré par radiolyse pulsée par une impulsion de 28 Gy. L'expérience est réalisée dans 2 mM Tris/HCl à pH 8.5. Dans ces conditions, nous avons déterminé précédemment qu'en fin de réaction nous obtenons 3 μM de SOR K48I oxydée. Immédiatement après la radiolyse, le dosage de H_2O_2 est réalisé par la méthode HRP/LCV. La radiolyse de l'eau, dans les conditions de l'expérience, produit 1.8 μM de H_2O_2 radiolytique, indépendamment de la réaction de la SOR avec $O_2^{\bullet-}$ (Daniels et Wigg, 1966). Le dosage de H_2O_2 correspond donc à H_2O_2 radiolytique plus H_2O_2 produit par la SOR. Le résultat est présenté Figure 88.

Production de H_2O_2 après : SOR K48I (20 μM) + $O_2^{\bullet-}$ (16.5 μM)	
[H_2O_2] dosée	[H_2O_2] corrigée de H_2O_2 radiolytique
5.28 \pm 0.14 μM	3.48 \pm 0.14 μM

Figure 88 : Dosage de H_2O_2 réalisé par la méthode HRP/LCV après la réaction de 20 μM de SOR K48I avec 16.5 μM de $O_2^{\bullet-}$ généré par radiolyse pulsée, dans 2 mM de tampon glycine pH 8.5 et 10 mM formiate. Le résultat représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

La réaction de 20 μM de SOR K48I avec 16.5 μM de $O_2^{\bullet-}$ génère 3.48 \pm 0.14 μM de H_2O_2 en fin de réaction, soit environ autant que de SOR oxydée formée dans ces mêmes conditions à ce pH (3 μM).

Par ailleurs, la quantité de H_2O_2 produit au cours de la réaction de la SOR K48I avec le superoxyde a aussi été étudiée par radiolyse continue. 23 μM de superoxyde sont générés par une irradiation au cobalt-60 de 7 min (40 Gy) d'une solution contenant 40 μM de SOR K48I et 10 mM de formiate dans 2 mM de tampon Mes pH 6 ou Tris/HCl pH 8.5. En fin d'expérience, un dosage de H_2O_2 est réalisé par la méthode HRP/LCV, en parallèle avec un spectre UV-visible de la solution irradiée.

Pour la SOR sauvage, autant de molécule de H_2O_2 sont produites que de SOR oxydées au cours de la réaction. Cependant, nous savons que H_2O_2 peut réagir avec la SOR et l'oxyder. La somme de [H_2O_2] et [SOR_{ox}] dosées à la fin de la réaction est comparée à celle

théoriquement attendue pour une oxydation stoechiométrique de la SOR par $O_2^{\bullet-}$. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau de la Figure 89.

SOR	pH	[H ₂ O ₂] finale† (μM)	[H ₂ O ₂] corr‡ (μM)	[SOR] oxydée* (μM)	[H ₂ O ₂]+[SOR _{ox}] dosée (μM)	[H ₂ O ₂]+[SOR _{ox}] attendue (μM)
WT	6	12	9	40	49	46
	8.5	12	9	30	39	46
K48I	6	9	6	8	14	46
	8.5	0	0	2	2	46

Figure 89 : Détermination des produits finaux de la réaction de la SOR sauvage ou le mutant K48I (40 μM) avec le superoxyde (23 μM) à pH 6 et 8.5, produit par radiolyse continue en présence de 10 mM formiate et 2 mM de tampon.

† Dosée par un dosage HRP/LCV.

‡ Corrigée du H₂O₂ radiolytique de 2.6 μM.

* Déterminée d'après le spectre UV-visible.

Nous constatons que, tout comme la concentration de SOR K48I oxydée, la concentration de H₂O₂ dosée en fin de réaction diminue lorsque le pH augmente. En fin de réaction, aux différents pH considérés, autant de moles de H₂O₂ sont dosées que de moles de SOR oxydées. Après réaction avec $O_2^{\bullet-}$, la SOR K48I se trouve donc majoritairement sous forme réduite Fe^{2+} , et ne produit pas de H₂O₂. La partie minoritaire de la SOR K48I qui s'est oxydée semble être responsable de la totalité de la formation de H₂O₂ avec une stoechiométrie identique à celle de la SOR sauvage. Ces expériences confirment les données précédentes obtenues par radiolyse pulsée.

En conclusion de ces expériences, pour le mutant K48I, la SOR Fe^{2+} formée en fin de réaction est bien issue d'une réaction du site actif avec $O_2^{\bullet-}$ et ne correspond pas à une fraction de la SOR réduite initiale qui n'aurait pas réagi avec $O_2^{\bullet-}$. Le spectre du 1^{er} intermédiaire est d'ailleurs pratiquement identique à celui de la SOR sauvage (Figure 85). De plus, si une partie du superoxyde n'avait pas réagi avec la SOR K48I, il se serait rapidement dismuté en H₂O₂ et aurait donc été dosé en fin de réaction, ce qui n'a pas été le cas.

Par ailleurs, la formation de l'espèce finale Fe^{2+} ne correspond pas à une réaction réversible de la fixation de $O_2^{\bullet-}$ sur le site actif de la SOR : $Fe^{2+} + O_2^{\bullet-} \leftrightarrow T_1$. En effet, si du superoxyde était relargué en fin de réaction, il serait rapidement dismuté en H₂O₂ et aurait donc été dosé en fin de réaction, ce qui n'a pas été le cas. La formation de l'espèce Fe^{2+} correspond donc bien à une évolution du T₁.

Il est à noter qu'aux pH plus acides la proportion du mutant K48I minoritaire qui évolue vers la formation de SOR oxydée et la production de H_2O_2 présente le même schéma réactionnel que la SOR sauvage avec $\text{O}_2^{\bullet-}$. A $\text{pH} < 8.5$, la fraction d'enzyme K48I qui est oxydée par $\text{O}_2^{\bullet-}$ présente des cinétiques modélisables par trois exponentielles, exactement comme la SOR sauvage, correspondant à la formation de trois espèces différentes. Les spectres du T_2 et de l'espèce finale de la SOR K48I présentent une absorbance faible par rapport à ceux de la SOR sauvage, ces spectres correspondent bien à la faible proportion de l'enzyme qui évolue vers la SOR oxydée. La dépendance de k_3 au pH, à $\text{pH} < 8.5$ est présentée en annexe (cf. Annexe 6). Au-delà de $\text{pH} 8.5$, l'évolution de T_1 correspond pratiquement à un retour à zéro quelque soit l'absorbance étudiée entre 500 et 700 nm, la grande majorité de la SOR K48I est alors sous forme Fe^{2+} .

La réactivité de la SOR K48I avec le superoxyde est schématisée ce dessous :

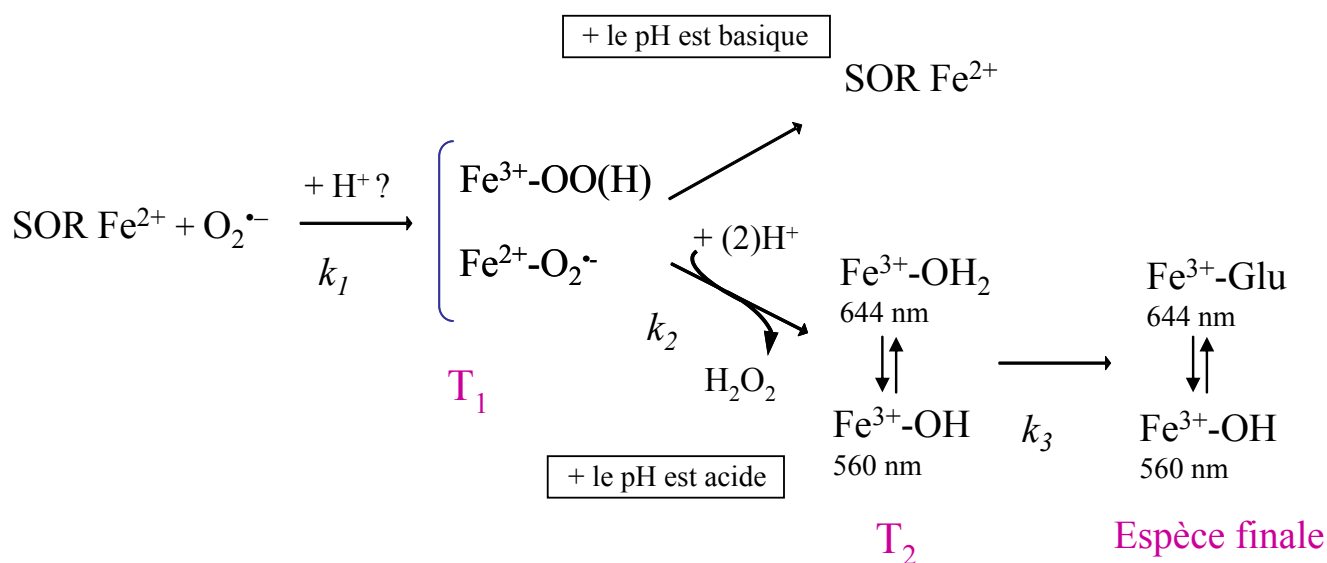


Figure 90 : Schéma du mécanisme de la SOR K48I avec $\text{O}_2^{\bullet-}$.

A pH acide (< 8.5), la réactivité d'une proportion du mutant K48I avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ apparaît identique à celle de la SOR sauvage. A pH basique, la réactivité de la quasi-totalité de l'enzyme est complètement modifiée, le T_1 se forme toujours, mais évolue directement vers la SOR réduite, sans former l'intermédiaire T_2 et la SOR oxydée.

C. Un nouvel intermédiaire réactionnel mis à jour

Afin de mieux comprendre le processus d'évolution du T_1 en SOR réduite pour le mutant K48I, nous avons étudié la dépendance de la constante de vitesse de disparition du T_1 (k_2) en fonction du pH (Figure 91). Les données de la Figure 91 montrent que la dépendance du k_2 au pH est similaire pour le mutant K48I et la SOR sauvage.

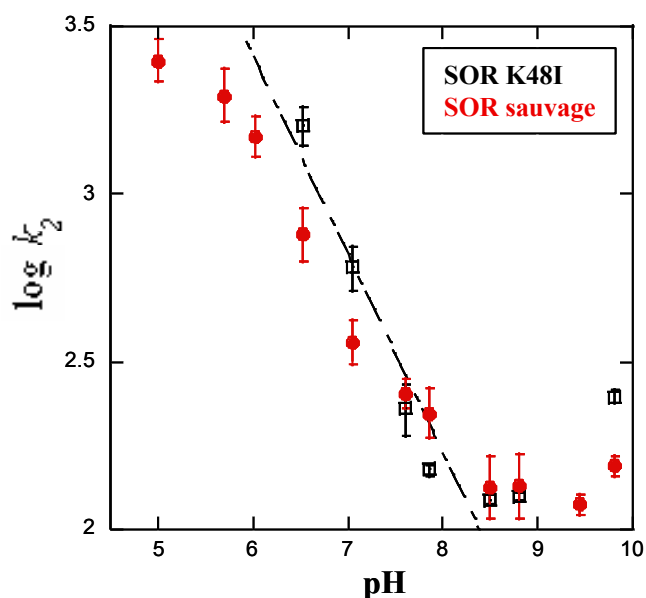


Figure 91 : Effet du pH sur la constante de vitesse k_2 , déterminée par radiolyse pulsée, pour la réaction de la SOR sauvage et le mutant K48I de *D. baarsii* (100 μ M), avec 8 μ M ou 12 μ M de $O_2^{\cdot-}$ dans 10 mM formiate et 2 mM tampon. Cette dépendance est modélisable entre pH 6 et pH 8.5 par l'équation : $\log k_2 = \log(k_0) - 0.59 \times \text{pH}$ avec $k_0 = 7.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour le mutant K48I et $\log k_2 = \log(k_0) - 0.61 \times \text{pH}$ avec $k_0 = 6.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour la SOR sauvage. k_0 représentant la valeur de k_2 lorsque le pH approche zéro.

Rappelons que pour la SOR sauvage, à $\text{pH} < 8.5$, la dépendance linéaire du $\log k_2$ au pH a été interprétée comme correspondant à une étape de protonation, avec un proton venant directement du solvant (H_3O^+). Lorsque le $\text{pH} > 8.5$, $\log k_2$ devient indépendant du pH et dans le cas de la SOR sauvage, cela a été interprété comme un processus de protonation par une molécule d'eau. Pour la SOR sauvage, dans tous les cas, à $\text{pH} > 8.5$ ou < 8.5 , la même espèce T_2 est produite.

La même dépendance au pH du k_2 pour le mutant K48I que pour la SOR sauvage laisse supposer que cette étape correspond à un processus de protonation identique que celle décrite pour la SOR sauvage. A pH basique, l'évolution de T_1 n'aboutit pas à la même espèce. La SOR sauvage forme l'intermédiaire $T_2 \text{ Fe}^{3+}\text{-OH}$, avec une bande caractéristique à 560 nm, alors que la SOR K48I forme une espèce Fe^{2+} , sans bande d'absorption entre 500 et 700 nm.

D'après ces données, il semble que k_2 représente une étape cinétiquement limitante commune à la SOR sauvage et au mutant K48I. Pour les deux protéines, nous proposons que cette étape pourrait être suivie d'une étape plus rapide, et donc non observable en cinétique rapide, qui conduirait à la formation d'une espèce intermédiaire supplémentaire, non observable, résultant directement du processus de protonation du T_1 décrit par k_2 . Nous proposons que cette espèce corresponde à un Fe^{3+} hydroperoxyde (T_{1-2}) (Figure 92). Dans la SOR sauvage cet intermédiaire serait ensuite protoné par une molécule d'eau sur l'oxygène proximal par l'intermédiaire de la lysine 48 pour permettre la libération de la molécule de H_2O_2 et la formation du 2nd intermédiaire T_2 .

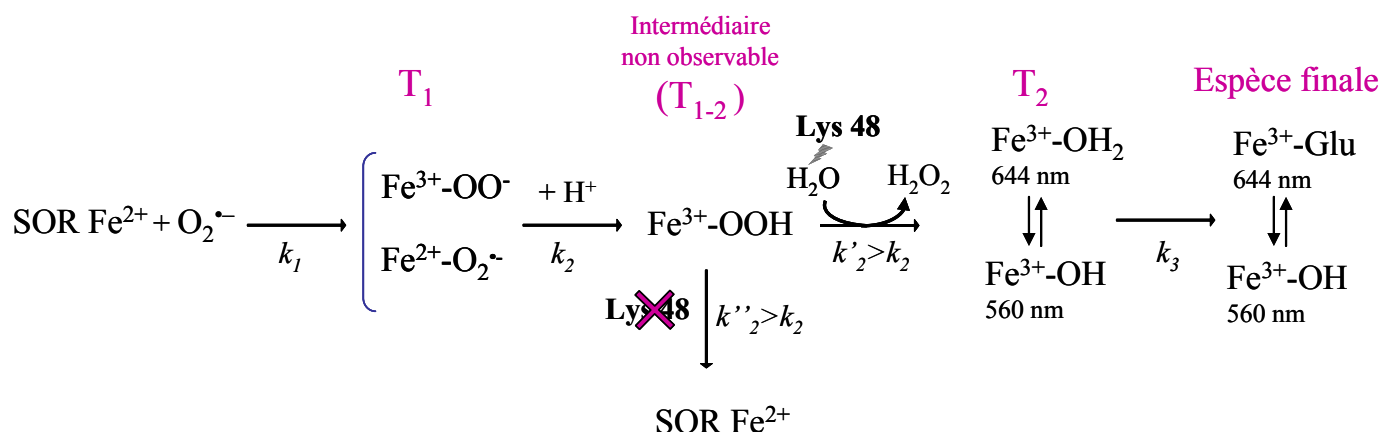


Figure 92 : Schéma du rôle de la lysine 48 dans le mécanisme de la SOR avec $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Ce schéma est tout à fait en accord avec nos données cinétiques et avec les structures RX qui suggèrent que la lysine 48 joue un rôle essentiel pour la protonation de l'oxygène proximal du Fe^{3+} -hydroperoxyde et la formation du produit H_2O_2 (Figure 93).

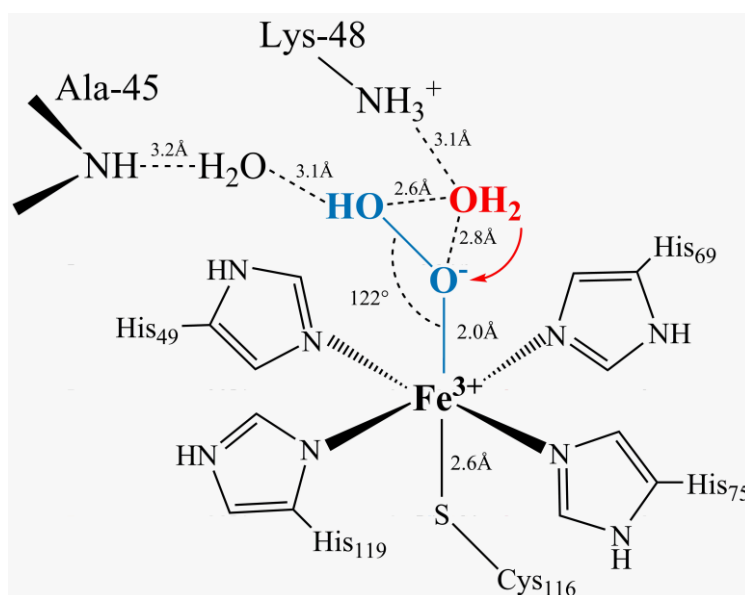


Figure 93 : Structure au RX de l'espèce Fe^{3+}OOH piégée au sein du site actif du mutant E114A, après réaction avec un léger excès de H_2O_2 (Katona et coll, 2007). La protonation de l'oxygène proximal du fer hydroperoxyde est possible par le positionnement optimal d'une molécule d'eau via un réseau de liaisons hydrogène avec la lysine 48.

En absence de la lysine 48, T_1 est toujours formé, et évolue toujours selon k_2 par un processus de protonation, mais ne conduit ni à la formation de T_2 et ni à la production de H_2O_2 . Au sein de la SOR mutée K48I, la protonation de l'oxygène proximal de $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ est donc complètement affectée par la mutation de la lysine. L'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ évolue majoritairement vers la formation d'une espèce Fe^{2+} sans libération de H_2O_2 . Nous verrons dans la partie suivante par quel mécanisme possible, l'absence de la lysine 48 et donc de protonation spécifique de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ (T_{1-2}), peut conduire à la formation de Fe^{2+} .

Des études préliminaires de radiolyse pulsée ont été réalisées sur la SOR de *T. pallidum* pour voir l'effet de cette lysine dans cet organisme et sont présentées en annexe (cf. Annexe 7).

♦ Activité catalytique de la SOR K48I

Les données précédentes (Figure 87) montrent que selon le pH, la réaction du mutant K48I avec $\text{O}_2^{\bullet-}$, produit au final un mélange de SOR Fe^{3+} et de SOR Fe^{2+} . Cependant, rappelons que dans les conditions de radiolyse pulsée, seule la demi-réaction d'élimination de $\text{O}_2^{\bullet-}$ par la SOR est observée. Le cycle catalytique complet doit aussi comprendre la réduction

de la forme Fe^{3+} par les réductases cellulaires, comme cela a été illustré dans la partie II du chapitre III, à l'aide de la Fpr de *E. coli* qui transfère efficacement ces électrons à la SOR oxydée (Figure 94).

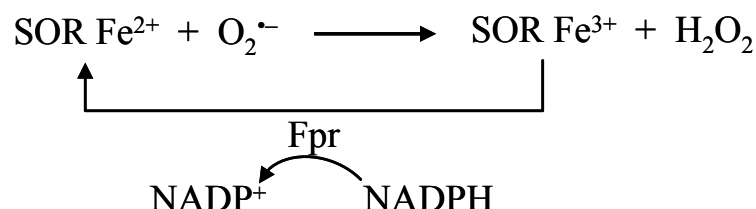


Figure 94 : Schéma de la catalyse de réduction du superoxyde en présence de SOR, de Fpr et de NADPH.

Nous avons étudié le cycle complet de l'activité catalytique de la SOR K48I en présence de NADPH, de $\text{O}_2^{\bullet -}$ et de Fpr. Le $\text{O}_2^{\bullet -}$ est généré en continu par le système xanthine oxydase (XO) et l'activité est suivie par l'absorbance à 340 nm, correspondant à l'oxydation de NADPH (Figure 95). La différence entre la pente d'oxydation de NADPH en présence et en absence de XO permet de déterminer l'activité NADPH-superoxyde-oxydoréductase (Cf. Chapitre III Partie II). Dans nos conditions, la production de superoxyde ainsi que la réduction de la SOR par la Fpr ne sont pas limitantes. Nos données montrent que l'activité NADPH-superoxyde-oxydoréductase varie de façon proportionnelle à la quantité de SOR sauvage ajoutée dans le milieu réactionnel. Les résultats sont présentés Figure 95.

Durant ces expériences, seule la proportion de SOR K48I oxydée après sa réaction avec le superoxyde nécessite l'activité des réductases pour réaliser un cycle catalytique complet et donc seule cette proportion de SOR oxydée doit conduire à une oxydation de NADPH. Nous avons vu précédemment que la proportion de SOR K48I oxydée en fin de réaction diminue fortement à pH basique. A pH 7.6, après réaction avec le superoxyde, environ 35% de SOR sont oxydés alors qu'à pH 9.1 seuls 15 % seront oxydés.

	[SOR] en μM	pH	μM de NADPH oxydé par min
SOR WT	1	7.6	12.1
SOR WT	1	9.1	12.4

	[SOR] en μM	pH	μM de NADPH oxydé par min
SOR K48I	1	7.6	5.9
SOR K48I	1	9.1	3.6

Figure 95 : Activité NADPH superoxyde oxydoréductase de la SOR sauvage et du mutant K48I de *D. baarsii*.

L'absorbance à 340 nm correspondant à l'oxydation de NADPH est suivie dans une cuve de 1 mL contenant 10 mM Tris/HCl pH 7.6, 200 μM NADPH, 500 unités/mL catalase, 500 μM hypoxanthine et 1 μM de flavodoxine réductase de *E. coli* (Fpr), à température ambiante. Après 1 min, 1 μM de SOR, sauvage ou K48I est ajouté, et après 2 min 30 s, une quantité de xanthine oxydase (XO) permettant de produire un flux de superoxyde de 30 $\mu\text{M}/\text{min}$ est ajoutée.

A pH 7.6, une activité NADPH-superoxyde-oxydoréductase de 12.1 μM NADPHox/min a été déterminée pour la SOR sauvage et de 5.9 μM NADPHox/min pour le mutant K48I (Figure 95). A pH 9.1, l'activité de la SOR sauvage reste inchangée, alors que celle de la SOR mutée K48I est plus faible (3.6 μM NADPHox/min) (Figure 95). Ces données confirment le fait que après la réaction du mutant K48I avec le superoxyde, la SOR K48I se retrouve sous les formes Fe^{2+} et Fe^{3+} et que la proportion de forme Fe^{2+} augmente à pH basique.

D'autre part, ces expériences d'oxydation du NADPH avec la SOR K48I mettent en évidence la capacité de cette protéine à réaliser des cycles catalytiques. En effet, lorsque 5.9 μM NADPH sont oxydés par min en présence de 1 μM de SOR K48I, la protéine effectue, au minimum, 12 cycles catalytiques par minute. De plus, cette activité reste constante durant au minimum 3 minutes, ce qui correspond au minimum à 36 cycles catalytiques. Cela démontre que l'espèce SOR Fe^{2+} obtenue après réaction du mutant K48I avec le superoxyde a la même réactivité avec le superoxyde que l'espèce Fe^{2+} initiale. En effet, si ce n'était pas le cas, la quantité de SOR K48I Fe^{2+} actif s'atténuerait au cours du temps et nous n'observerions rapidement plus d'oxydation du NADPH. A pH 7.6, par exemple, 60 % de la quantité de SOR K48I Fe^{2+} actif perdrait de son activité à chaque cycle catalytique. Ces expériences démontrent que la forme Fe^{2+} produite en fin de réaction du mutant K48I avec le superoxyde a les mêmes propriétés réactionnelles que celle de la forme Fe^{2+} initiale.

IV. Propriétés des espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$

A. Introduction

Nous avons mis en évidence que le mutant K48I réagit avec le superoxyde pour former, comme pour l'enzyme sauvage, un premier intermédiaire réactionnel T_1 . Cependant, dans le mutant K48I, T_1 évolue différemment puisqu'une espèce Fe^{2+} très similaire à celle de l'enzyme initiale est observée en fin de réaction. D'autre part, aucune production de H_2O_2 n'est observée au cours de la réaction du mutant K48I avec $\text{O}_2^{\cdot-}$. Nous avons émis l'hypothèse que la mutation K48I modifie la réactivité de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. La réactivité de cet intermédiaire étant difficilement accessible lorsqu'il est formé à partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (il disparaît à l'échelle de la ms), nous avons étudié la réactivité de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ formée par réaction entre la SOR K48I et H_2O_2 . Nous avons regardé en particulier sa capacité à oxyder des substrats afin de voir si ce type de réactivité pourrait expliquer l'évolution de l'intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ en Fe^{2+} et l'absence de formation de H_2O_2 .

B. Formation de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ au sein de la SOR K48I

Etude par spectroscopie de résonance Raman

Des espèces $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ont pu être piégées à basse température au sein du site actif de la SOR en faisant réagir la protéine avec un léger excès de H_2O_2 (Mathé et coll, 2002 ; Mathé et coll, 2006 ; Mathé et coll, 2007). Les espèces fer-(hydro)peroxo ont pu alors être bien identifiées par résonance Raman, par l'observation de vibrations spécifiques des liaisons Fe-O et O-O. Notons que ces espèces ont été caractérisées à partir de SORs mutées sur les positions E47 (mutant E47A) (Mathé et coll, 2005) et E114 (mutant E114A) (Mathé et coll, 2007). Ces mutations induisent une certaine stabilisation du fer-hydroperoxyde et facilitent son piégeage par simple congélation.

Afin de vérifier si le mutant K48I est capable lui aussi de stabiliser une espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-hydroperoxyde}$ au niveau de son site actif, la protéine sous forme réduite Fe^{2+} a été mélangée avec 30 équivalents de H_2O_2 à 4°C, puis rapidement congelée sous un flux d'azote à 100 K (3 à 5 secondes après le mélange). L'espèce formée a alors été étudiée par spectroscopie de résonance Raman. La présence du tampon Tris/HCl, connu pour être un bon piègeur de radicaux HO^{\cdot} , permet de limiter d'éventuelles altérations protéiques si une chimie de type

Fenton se produit au cours du mélange Fe^{2+} et H_2O_2 (Laulhère et coll, 1989). Les spectres Raman sont enregistrés à 100 K (Figure 96).

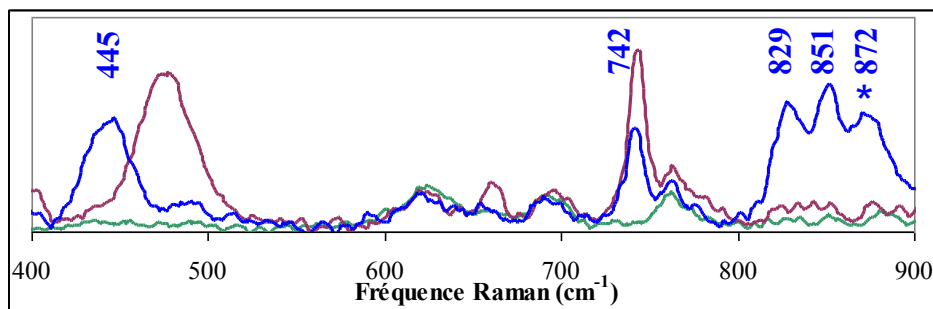


Figure 96 : Spectres de résonance Raman du site actif du mutant SOR K48I de *D. baarsii*, 7 mM, dans un tampon 50 mM Tris/HCl pH 8.5 ; Forme réduite (**vert**), après réaction avec 30 équivalents de H_2O_2 (**bleu**), oxydé par 2 équivalents de K_2IrCl_6 (**mauve**). *Conditions d'enregistrement* : Longueur d'onde d'excitation laser : 633 nm. Température : 100 K. Volume de l'échantillon 1 μL . Accumulation : 10×10 s.

Les bandes indiquées par (*) sont dues à H_2O_2 ajouté qui n'a pas réagi.

Comme pour la SOR sauvage (Mathé et coll, 2006), le spectre de résonance Raman du mutant K48I sous forme réduite ne présente pas de bande entre 400 et 900 cm^{-1} . Après oxydation par du chlorure d'iridium, le spectre du mutant K48I présente une bande à 475 cm^{-1} correspondant à la vibration de la liaison Fe-OH du ligand hydroxyde observée à pH 8.5 sur ce mutant (Mathé et coll, 2005). Le spectre présente également une bande à 742 cm^{-1} , correspondant à la vibration de la liaison C-S du ligand Cys. Le spectre du mélange SOR K48I avec H_2O_2 présente 3 nouvelles bandes Raman autour de 851 cm^{-1} et une bande à 445 cm^{-1} . La bande du Fe^{3+} -OH à 475 cm^{-1} a pratiquement disparu. La bande à 872 cm^{-1} correspond sans doute à H_2O_2 qui n'a pas réagi avec la SOR (Mathé et coll, 2006). Cependant, au cours des accumulations des spectres de résonance Raman, l'intensité des bandes à 445 et 851 cm^{-1} diminue fortement. Le temps d'accumulation a donc été minimisé afin de ne pas perdre les signaux au cours de l'enregistrement. Ces bandes semblent assez caractéristiques des vibrations des liaisons Fe-O et O-O d'un fer hydroperoxyde. Afin de préciser ces attributions, les expériences de résonance Raman ont été réalisées avec de H_2O_2 marqué ^{18}O (Figure 97).

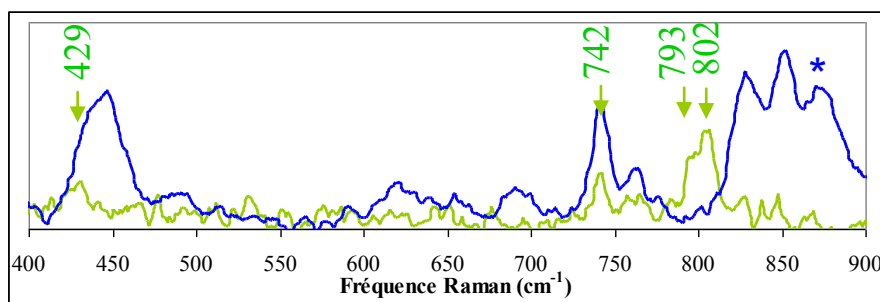


Figure 97 : Spectres de résonance Raman du site actif du mutant SOR K48I de *D. baarsii* réduit (4 mM) après réaction de sa forme réduite avec 30 équivalents de $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (**bleu**), ou 6 équivalents de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (**vert**). La protéine est dans un tampon 50 mM Tris/HCl pH 8.5. Conditions d'enregistrement : Longueur d'onde d'excitation laser : 633 nm. Température : 100 K. Volume de l'échantillon 1 μL . Accumulation : 2×10 s.

Les bandes indiquées par (*) sont dues à H_2O_2 ajouté qui n'a pas réagi.

Après réaction de la SOR K48I avec $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, des bandes à 429, 742 et 802 cm^{-1} sont observées, elles sont cependant très faibles. La solution de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ utilisée étant peu concentrée, il n'a pas été possible de faire réagir un très large excès de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ avec la SOR, ce qui semble important pour bien visualiser les bandes de l'espèce fer-hydroperoxyde dans le cas du mutant K48I (Figure 97, spectre bleu). Bien que l'interprétation de ce spectre obtenu avec $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ soit difficile, il semble que les deux bandes à 851 et 829 cm^{-1} en $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ se soient décalées vers 793 et 802 cm^{-1} . La bande à 455 cm^{-1} en $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ se serait décalée vers 420 cm^{-1} en $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$. Ces déplacements de bandes correspondent à ceux attendus pour un fer-hydroperoxyde. En effet, selon la loi de Hooke, des déplacements isotopiques de -49 cm^{-1} et -20 cm^{-1} pour des vibrations O-O et Fe-O sont attendus respectivement. La bande à 445 cm^{-1} correspondrait donc à la vibration de la liaison Fe-O et les deux bandes à 829 et 851 cm^{-1} à la vibration de O-O du fer-hydroperoxyde. La présence des deux bandes à 829 et 851 cm^{-1} pourrait refléter une certaine hétérogénéité de structure au niveau du peroxy, avec par exemple la présence ou non de liaisons hydrogène sur l'oxygène distal.

Ces données sont donc en faveur de la présence d'un fer-hydroperoxyde piégé au sein du site actif du mutant K48I après réaction avec H_2O_2 .

Notons que la fréquence est plus élevée de 8 cm^{-1} pour le $\nu(\text{Fe-O})$ dans le mutant K48I par rapport à la SOR sauvage (Mathé et coll, 2006). Ceci suggère un renforcement significatif de la liaison Fe-O du fer-hydroperoxyde du mutant K48I. De plus un déplacement de la fréquence du mode $\nu(\text{Fe-O})$ de + 5 cm^{-1} a été également observé pour le ligand $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ chez le mutant K48I par rapport à la SOR sauvage (Mathé et coll, 2005). Cette variation de fréquence et donc de stabilité est à relier à l'absence de réseau de liaisons hydrogène, présentes dans la structure cristallographie de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ (Katona et coll, 2007). Le

mutant SOR K48I qui ne forme plus ce réseau de liaisons hydrogène avec le peroxyde, peut donc conduire à un renforcement de la liaison Fe-O du peroxyde et ainsi à sa stabilisation au site actif de la SOR.

La même expérience a été réalisée à partir de la réaction de la SOR K48I sous forme Fe^{3+} avec 6 équivalents de H_2O_2 . Le spectre obtenu a une allure proche de celui en tracé bleu de la Figure 96. Cependant, l'ensemble des bandes obtenues a une intensité très faible et la disparition des bandes du peroxyde au cours des accumulations est assez rapide. Le fer-hydroperoxyde semble aussi se former lors du mélange du mutant K48I sous forme Fe^{3+} avec H_2O_2 .

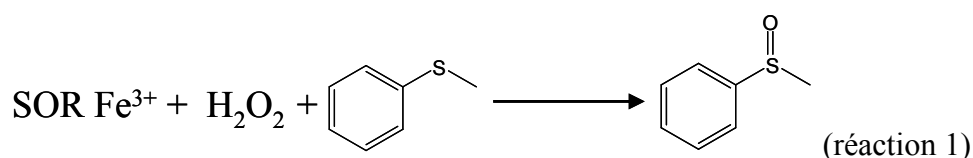
En conclusion, la SOR K48I semble donc bien capable de stabiliser une espèce de type $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ au sein de son site actif, après réaction avec H_2O_2 . Ce résultat renforce notamment l'hypothèse de l'existence d'un intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ durant la réaction de la SOR K48I avec le superoxyde.

C. Réactivité de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$

1. Réaction de sulfoxydation par le mutant SOR K48I

Nous avons étudié la réactivité de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$, obtenue à partir de la réaction de la SOR K48I Fe^{3+} avec H_2O_2 , vis-à-vis de l'oxydation de substrats organiques. Le substrat de choix est le thioanisole, classiquement utilisé pour étudier les propriétés d'oxydation des espèces fer-peroxyde formées sur des complexes de fer et tout particulièrement, les réactions de transfert d'oxo (Mekmouche et coll, 2002). Le thioanisole peut être oxydé à 2 électrons pour donner le sulfoxyde correspondant, facilement quantifiable par chromatographie en phase gazeuse (GC).

Nous avons donc étudié la quantité de sulfoxyde formée lors de la réaction du mutant K48I avec H_2O_2 en présence de thioanisole (réaction 1). Les spectres d'absorption de la solution sont pris en fin de réaction afin de déterminer l'état redox du site actif de la SOR.



100 μM de SOR Fe^{2+} ou Fe^{3+} , K48I ou sauvage, sont mélangés avec 100 μM de H_2O_2 dans 100 μL contenant 3 mM thioanisole, 0.4 M d'éthanol, 10 mM Tris/HCl pH 8.5. L'éthanol est présent dans le milieu afin d'augmenter la solubilité du thioanisole qui est faible dans l'eau. La réaction se déroule sur 10 min, temps au delà duquel plus aucune variation d'absorbance n'est observée. La quantité de méthyl phényl sulfoxyde formé est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Dans le cas des réactions avec la SOR Fe^{3+} , les spectres d'absorbance de la solution montrent que la bande à 560 nm, correspondant au Centre II oxydé, diminue au cours du temps jusqu'à disparaître. L'ajout de chlorure d'iridium dans la solution en fin de réaction induit l'apparition d'une bande à 560 nm, identique à celle de la solution avant l'ajout de H_2O_2 . La protéine est donc totalement réduite en fin de réaction et n'a apparemment pas subi de dégradation. Différentes conditions ont été testées, les résultats sont les suivants (Figure 98) :

	mélange initial			produits finaux	
	SOR	H_2O_2	thioanisole	sulfoxyde	SOR
a	K48I Fe^{3+} 100 μM	100 μM	3 mM	45 μM	Fe^{2+} 100 μM
b	WT Fe^{3+} 100 μM	100 μM	3 mM	0 μM	Fe^{3+} 60 μM / Fe^{2+} 40 μM
c	K48I Fe^{3+} 100 μM	/	3 mM	0 μM	Fe^{3+} 100 μM
d	/	100 μM	3 mM	0 μM	/
e	K48I Fe^{2+} 100 μM	100 μM	3 mM	0 μM	Fe^{2+} 100 μM
f	K48I Fe^{3+} 100 μM	1 mM	3 mM	45 μM	Fe^{2+} 100 μM
g	K48I Fe^{3+} 100 μM	100 μM	/	/	Fe^{2+} 100 μM

Figure 98 : Réactions de sulfoxydation du thioanisole en présence de la SOR de *D. baarsii* et de H_2O_2 dans 0.4 M d'éthanol, 10 mM Tris/HCl pH 8.5. Temps de réaction : 10 min à T ambiante. Les données représentent la moyenne de, au minimum 3 expériences indépendantes. D'une expérience à l'autre les valeurs varient au maximum de 30%.

Les données montrent que la sulfoxydation du thioanisole est liée à la réaction du mutant K48I avec H_2O_2 . En effet, en absence de la protéine ou de H_2O_2 , aucun sulfoxyde n'est détecté (Figure 98, ligne c et d).

De plus, la sulfoxydation du thioanisole est spécifique du mutant K48I, la même réaction avec la SOR sauvage n'induit pas de sulfoxydation (Figure 98, ligne b).

Par ailleurs, cette réaction est dépendante de l'état d'oxydation fer ferrique de la protéine (Figure 98, ligne a et e). Nous avons vu en spectroscopie de résonance Raman que l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ se forme par réaction de H_2O_2 avec le mutant K48I sous forme Fe^{3+} et sous forme Fe^{2+} . La différence de réaction observée Figure 98 entre la SOR K48I initialement

sous forme Fe^{3+} et Fe^{2+} , pourrait être du à une différence de cinétique de formation du fer-hydroperoxyde selon l'état d'oxydation du fer initial. La formation du fer-hydroperoxyde peut être plus rapide lorsque la SOR K48I est initialement sous forme Fe^{3+} que lorsqu'elle est sous forme Fe^{2+} . Ainsi, un temps de réaction de 10 min peut être trop court pour observer la sulfoxydation si la SOR K48I sous forme Fe^{2+} est mélangée avec un équivalent de H_2O_2 .

Enfin, si la concentration de H_2O_2 initiale est augmentée (Figure 98, ligne f), il n'y a pas d'augmentation de sulfoxyde formé et la quantité de thioanisole oxydé est toujours égale à la moitié de la quantité de SOR initiale. La réaction n'est donc pas catalytique (Figure 98 ligne f). Notons également qu'en absence du thioanisole, une réduction du mutant K48I est observée (Figure 98 ligne g). De façon surprenante H_2O_2 a la capacité de réduire la SOR, avec une cinétique assez lente sur une dizaine de minutes. Cette réduction par H_2O_2 se fait complètement pour le mutant K48I et à environ à 50 % pour la SOR sauvage. L'étude de la réduction de la SOR K48I par H_2O_2 est présentée en annexe (cf. Annexe 8).

Pour résumer, la sulfoxydation du thioanisole est spécifique de la réaction entre le mutant K48I Fe^{3+} et H_2O_2 . Les données de résonance Raman suggèrent fortement que cette réaction induit la formation d'une espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. Différentes espèces oxydantes, potentiellement capables d'oxyder le thioanisole et pouvant être générées au cours des expériences de sulfoxydation sont envisageables : (i) L'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$. (ii) Nous pouvons envisager que l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ subisse une cassure homolytique au niveau de la liaison O-O et forme une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ et un radical HO^\bullet . (iii) Enfin, il est possible que la liaison O-O se casse de manière hétérolytique conduisant aux espèces $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$ et HO^- .

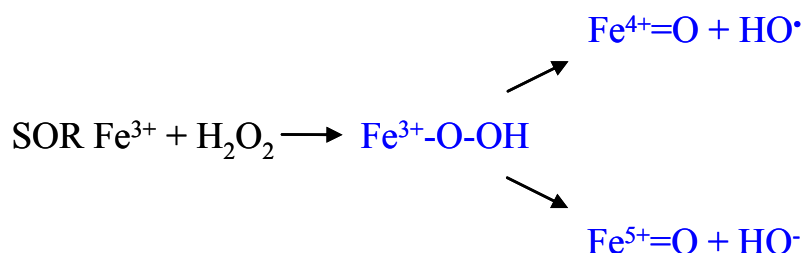


Figure 99 : Espèces oxydantes potentiellement présentes dans les expériences de sulfoxydation.

Afin d'essayer de préciser laquelle de ces espèces oxydantes réalise la sulfoxydation du thioanisole, les expériences suivantes sont réalisées.

Il a été rapporté que les espèces fer-oxo sont capables, dans certains cas, d'échanger quasi instantanément leur oxygène avec un oxygène d'une molécule d'eau (Bernadou et Meunier, 1998). Cet échange peut se visualiser à l'aide de marquage isotopique, soit du peroxyde d'hydrogène marqué ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$) dans de l'eau non marquée soit de l'eau marquée (H_2^{18}O) avec du peroxyde d'hydrogène non marqué. Si au cours de la réaction de sulfoxydation une espèce fer-oxo est formée et est capable d'échanger son oxygène avec l'eau, un marquage ^{18}O doit être retrouvé sur le produit d'oxydation en présence d'eau marquée (H_2^{18}O). Inversement, en présence de peroxyde d'hydrogène marqué ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$) et d'eau non marquée, le sulfoxyde doit perdre une partie de son marquage isotopique.

Les expériences de marquage isotopique ont donc été réalisées dans des conditions similaires à celle de la Figure 98. L' $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ utilisé est marqué à 90%. Le produit de la réaction est analysée par spectromètre de masse (ESI-MS) et permet de quantifier la proportion de sulfoxyde marqué ^{18}O . Lorsque 150 μM de SOR K48I Fe^{3+} sont mélangés avec 150 μM de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ en présence de 3.7 mM de thioanisole dans un milieu contenant 10 mM Tris/HCl pH 8.5 et 0.4 M d'éthanol, 50 % du méthyl phényl sulfoxyde produit est marqué ^{18}O en fin de réaction (moyenne réalisée sur deux expériences) (Figure 100). Le bilan global de la réaction est inchangé par rapport aux données de la Figure 98, 50 % du sulfure est oxydé en fin de réaction et toute la SOR est sous forme réduite après 10 min de réaction.

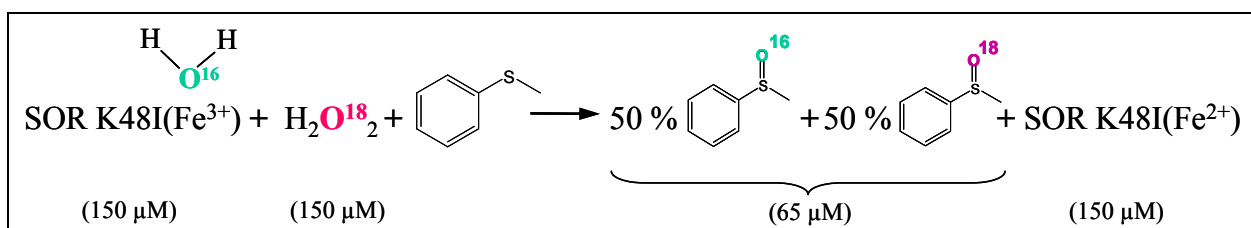


Figure 100 : Sulfoxydation du thioanisole (3.7 mM) en présence du mutant K48I de *D. baarsii* (150 μM) et de $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (150 μM), dans 10 mM Tris/HCl pH 8.5 et 0.4 M d'éthanol, en milieu aérobie.

L'expérience de marquage est alors réalisée dans l'autre sens, c'est-à-dire en présence d'eau marquée H_2^{18}O et de H_2O_2 non marqué. De la même manière que précédemment la quantité de sulfoxyde marqué ^{18}O est analysée par spectroscopie de masse. Dans ces conditions, aucun sulfoxyde marqué n'est détecté (Figure 101).

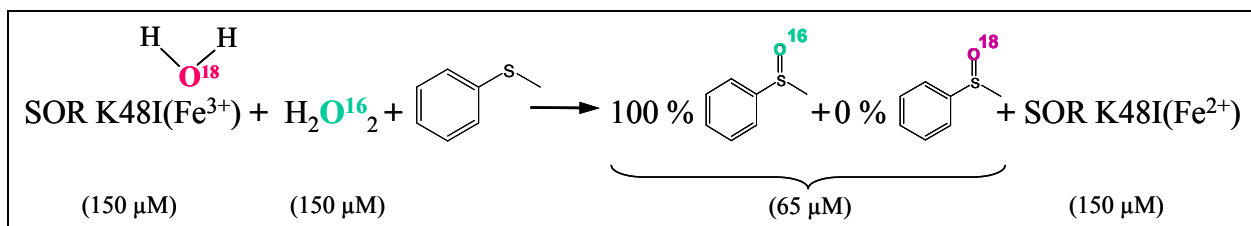


Figure 101 : Sulfoxydation de thioanisole (3.7 mM) en présence du mutant K48I de *D. baarsii* (150 μM) et de H₂¹⁶O₂ (150 μM) en solution aqueuse marquée H₂¹⁸O, 10 mM Tris/HCl pH 8.5 et 0.4 M d'éthanol, en milieu aérobie.

Ces données suggèrent que s'il y a formation d'une espèce fer-oxo, elle n'échange pas son oxygène avec le solvant. Le phénomène d'échange tautomérique oxo-hydroxo décrit pour les espèces fer-oxo de porphyrines avec l'eau implique une position de coordination libre sur le site métallique sur laquelle une molécule d'eau vient se fixer (Bernadou et Meunier, 1998). Avec un éventuel ligand oxo, le fer de la SOR devient hexacoordiné et il est difficile d'envisager la fixation supplémentaire d'une molécule d'eau. Ainsi la perte de marquage observée dans l'expérience de la Figure 100 pourrait être due à une autre raison que cet échange oxo-hydroxo. Il est possible qu'un autre partenaire puisse être impliqué dans ce mécanisme. Peut-il s'agir du dioxygène présent dans la solution ? Afin de répondre à cette question, la même expérience de sulfoxydation que celle présentée dans la Figure 100, en présence de H₂¹⁸O₂, est réalisée en anaérobiose, sous atmosphère d'azote (Figure 102). Le bilan global de la réaction est inchangé, 65 μM de sulfoxyde sont détectés en fin de réaction et toute la SOR est Fe²⁺ après 10 min de réaction.

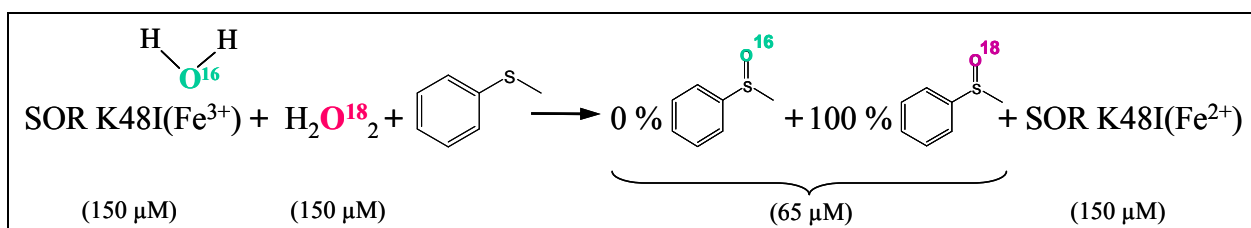


Figure 102 : Sulfoxydation de thioanisole (3.7 mM) en anaérobiose en présence du mutant K48I de *D. baarsii* (150 μM), et de H₂¹⁸O₂ (150 μM) dans 10 mM Tris/HCl pH 8.5 et 0.4 M d'éthanol, sous atmosphère d'azote.

A la différence des expériences en aérobie, d'après les analyses de masse, 90% du sulfoxyde est marqué O¹⁸, soit la même que H₂¹⁸O₂ présent initialement

Ces données démontrent l'implication du dioxygène dans le mécanisme d'oxydation du thioanisole en milieu aérobie.

De manière remarquable, que l'expérience de sulfoxydation soit réalisée en milieu aérobie (Figure 100) ou en milieu anaérobie (Figure 102), la quantité de sulfoxyde formée est la même. Cela suppose que les mécanismes de sulfoxydation faisant intervenir ou non le dioxygène possèdent un intermédiaire commun. De plus, l'implication de O_2 dans la réaction de sulfoxydation suggère fortement le passage par une espèce radicalaire. Cet intermédiaire radicalaire est probablement un radical au substrat S^{++} .

Ces expériences de marquage isotopique ne permettent pas de démontrer directement qu'une espèce fer-oxo se forme au sein du site actif de la SOR. Cependant l'implication du dioxygène dans la réaction de sulfoxydation suppose la formation d'une espèce intermédiaire radicalaire sur le thioanisole. L'espèce Fe^{3+} -OOH ne peut pas former cette espèce radicalaire, des espèces fortement oxydantes comme HO^\bullet ou une espèce fer oxo sont de bien meilleurs candidats pour cela.

2. Production de HO^\bullet ?

Afin de regarder si l'espèce fer-péroxyde de la SOR K48I peut subir une cassure homolytique et former du HO^\bullet , nous avons réalisé les expériences suivantes.

La spectroscopie RPE est l'une des techniques les mieux adaptées pour la détection des radicaux HO^\bullet . Ces radicaux sont des espèces très instables, et donc difficiles à observer. Pour pallier à cet inconvénient, la stratégie la plus communément employée est le piégeage des radicaux (spin trapping) par addition sur une molécule organique insaturée (spin trap) (Buettner, 1987). L'adduit (spin adduct) est aussi un radical mais beaucoup plus stable que le radical initial. Les couplages hyperfins du spectre RPE de l'adduit apportent des informations spécifiques sur la nature de l'espèce radicalaire piégée. L'un des piègeurs le plus souvent utilisé est le 5-5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyle (DMPO). Le radical HO^\bullet réagit instantanément sur le DMPO ($k = 4.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) pour donner l'adduit DMPO-OH $^\bullet$, dont la stabilité est élevée ($T_{1/2} = 2 \text{ h}$) (Finkelstein et coll, 1980). L'adduit formé, un nitroxyde, présente un spectre RPE caractéristique, centré à $g = 2.005$. Il comporte quatre raies provenant du couplage de l'électron célibataire localisé sur l'oxygène avec un atome d'azote ($S=1$) et un atome d'hydrogène $H\beta$ ($S=1/2$) (Finkelstein et coll, 1982). Les constantes de couplage sont identiques (Figure 103). Cette méthode de piégeage de radicaux est très sensible et permet de détecter des radicaux HO^\bullet à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} M . Néanmoins cette technique ne peut pas apporter des informations quantitatives car le signal RPE observé reflète un équilibre entre la production et la décomposition de l'adduit.

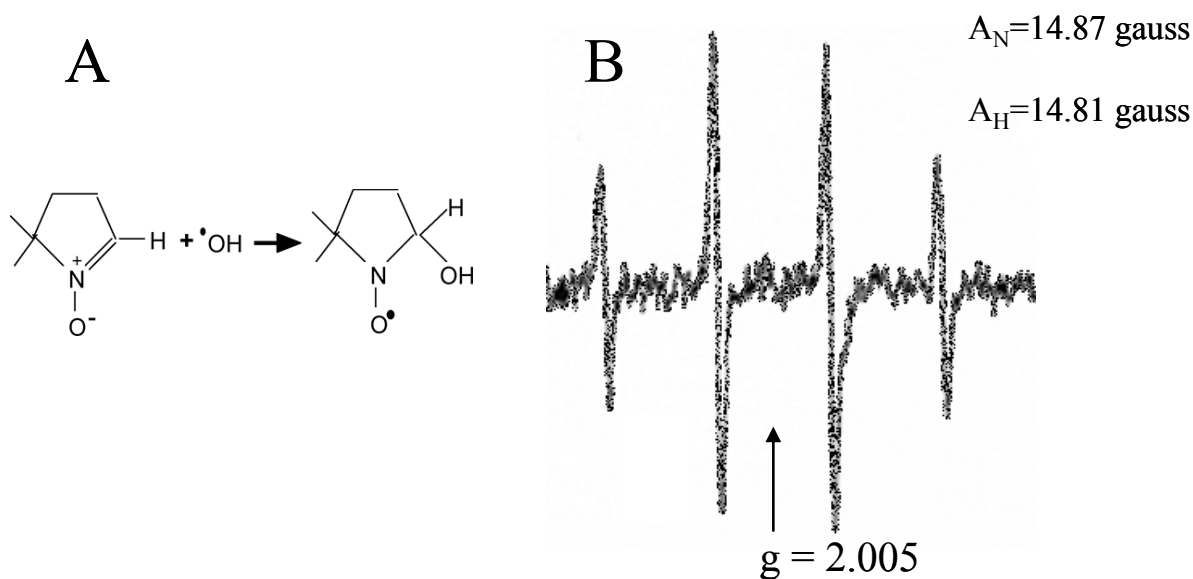


Figure 103: (A) Réaction du DMPO avec HO^\bullet . (B) Spectre RPE de l'adduit DMPO-OH enregistrés à température ambiante. A_N et A_H représentent les valeurs de couplage hyperfin entre l'électron célibataire localisé sur l'oxygène et l'azote ou l'hydrogène.

Nous avons donc cherché à identifier la présence de radical HO^\bullet lors de la réaction de la SOR K48I Fe^{3+} avec H_2O_2 . Afin de détecter la formation de HO^\bullet dans le milieu, 150 μM SOR K48I Fe^{3+} sont mélangés avec 300 μM de H_2O_2 en présence de 45 mM de DMPO et de 2 mM Tris/HCl pH 8.5. Immédiatement après un spectre RPE est enregistré à température ambiante (Figure 104).

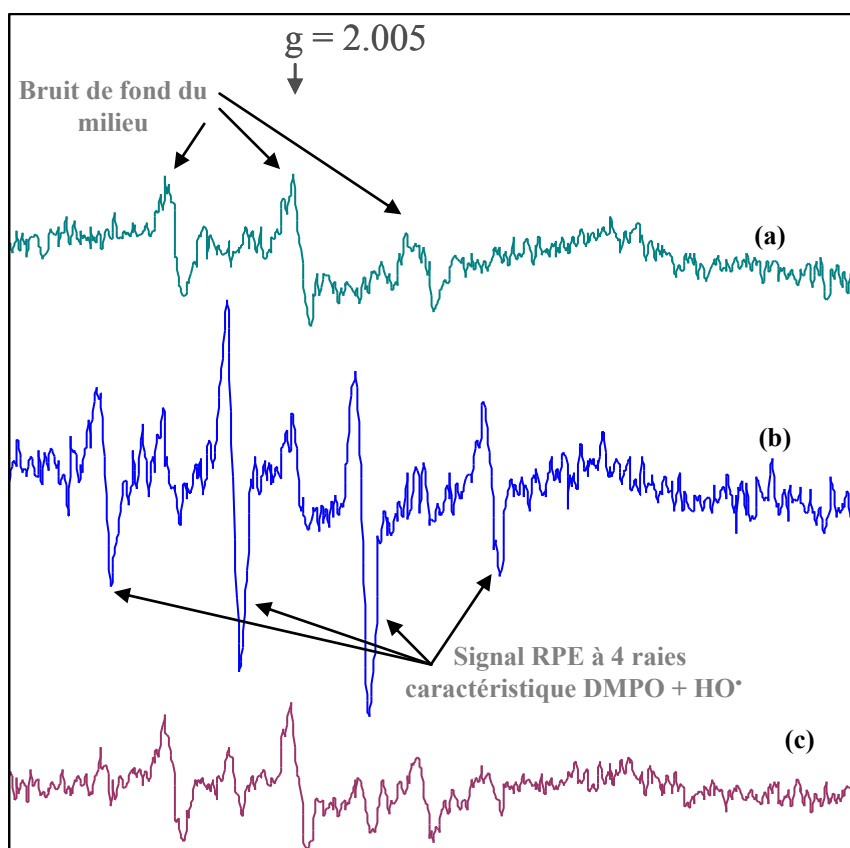


Figure 104 : Spectre RPE autour de $g = 2$ du produit de la réaction de SOR (150 μM) et H_2O_2 (300 μM) en présence de DMPO (50 mM) dans 2 mM Tris/HCl pH 8.5 (a) SOR Fe^{3+} sauvage sans thioanisole, (b) mutant K48I Fe^{3+} sans thioanisole, (c) mutant K48I Fe^{3+} en présence de thioanisole (2.5 mM) et d'éthanol (0.2 M). Le spectre RPE est enregistré à température ambiante.

Lorsque la SOR K48I Fe^{3+} est mise à réagir avec H_2O_2 en présence de DMPO, la présence de HO^\bullet est détectée (Figure 104b). Si la même expérience est réalisée en présence de la SOR sauvage Fe^{3+} , aucun radical HO^\bullet n'est détecté (Figure 104a). De même, si la même expérience est réalisée en absence de protéine ou de H_2O_2 , le même spectre que celui de la Figure 104a est retrouvé. Par ailleurs si la SOR K48I Fe^{3+} est mise à réagir avec H_2O_2 en présence de DMPO et de thioanisole, une petite quantité de HO^\bullet est détecté (Figure 104c). Notons que la solubilisation du thioanisole nécessite la présence d'éthanol à une concentration de 200 mM. L'éthanol est un très bon piègeur de HO^\bullet et peut donc perturber la détection du HO^\bullet par le DMPO. Néanmoins un signal dû à la présence de HO^\bullet dans le milieu est encore visible. Le signal du bruit de fond présent sur l'ensemble des spectres est dû à une impureté de la solution de DMPO.

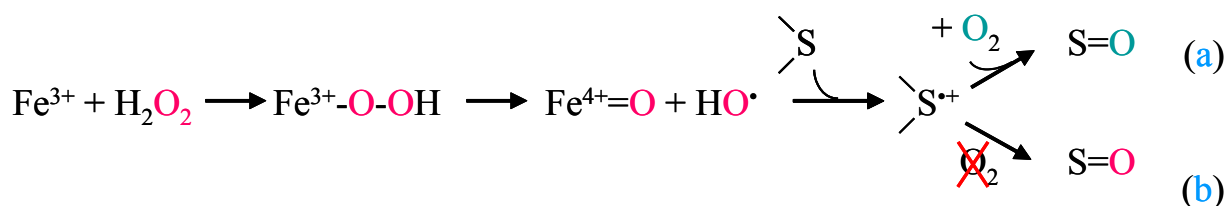
Le fait qu'avec la SOR sauvage Fe^{3+} , aucun HO^\bullet n'est détecté suggère que la formation de HO^\bullet est spécifique au mutant K48I et est donc une propriété propre au mutant K48I.

Il semble donc que l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ formée par réaction du mutant K48I Fe^{3+} avec H_2O_2 subisse une cassure homolytique de la liaison O-O, entraînant la libération de HO^\bullet dans le milieu et la formation de $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$. Cette formation de HO^\bullet doit donc se retrouver aussi lors des réactions d'oxydation du thioanisole

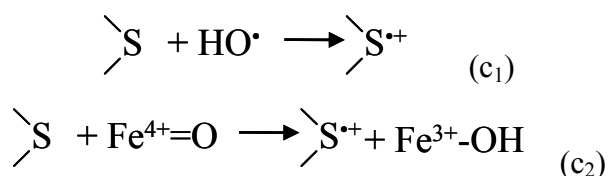
3. Conclusions et proposition de mécanisme de sulfoxydation

La réaction du mutant SOR K48I Fe^{3+} avec H_2O_2 en présence de thioanisole conduit à la formation de sulfoxyde et de Fe^{2+} . Au cours de cette réaction, tout semble indiquer que l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ est générée. De plus, la mise en évidence de formation du radical HO^\bullet supporte le fait que cette espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ évolue vers la formation d'espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ et HO^\bullet par cassure homolytique de la liaison O-O. Cette évolution du $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ semble être spécifique du mutant K48I.

Les expériences des sulfoxydations avec du marquage isotopique suggèrent que le mécanisme de sulfoxydation, en présence ou non de O_2 , passe par la formation d'un radical $\text{S}^{\bullet+}$, comme cela est présenté ci-dessous :

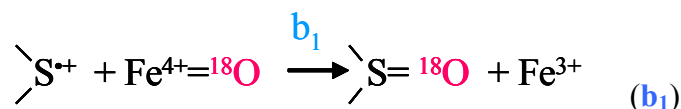


Il est difficilement concevable qu'un tel radical puisse être formé directement par l'espèce fer-peroxyde. Cependant il peut être généré par HO^\bullet ou par le $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ selon les réactions suivantes :

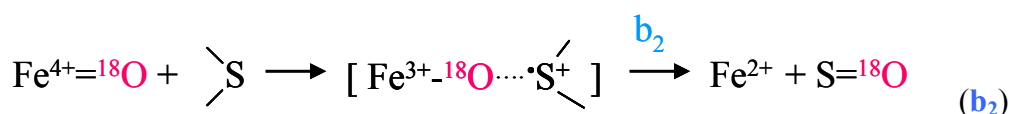


Notons que ces deux réactions peuvent tout à fait se dérouler en parallèle. Cependant nos données ne nous permettent pas de savoir si une des deux réactions est majoritaire.

Ainsi en absence de O_2 , l'espèce radicalaire S^{++} , si elle est formée, peut réagir avec $Fe^{4+}=O$ pour donner le sulfoxyde selon la réaction suivante :

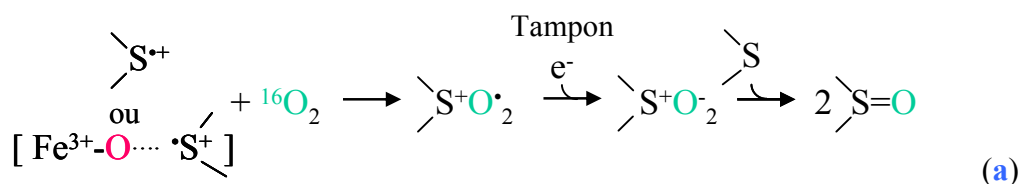


Il est aussi possible de considérer la réaction suivante :



Ces trois réactions peuvent rendre compte d'un marquage à 100 % du sulfoxyde en absence de O_2 et en présence de $H_2^{18}O_2$ marqué.

En présence d'oxygène, S^{++} peut réagir avec O_2 pour former le sulfoxyde selon la réaction (a) présenté ci-dessous (Memarian et coll, 2006).

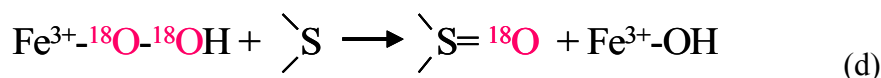


Cette réaction expliquerait la proportion de sulfoxyde non marqué détectée en fin de réaction avec $H_2^{18}O_2$ (Figure 102) en milieu aérobie. En effet, lorsque O_2 intervient dans la sulfoxydation (réaction a), aucun marquage ne se produit. La présence de marquage à 50 % du sulfoxyde formé peut être liée à la réaction de S^{++} avec $Fe^{4+}=O$ ou HO^\bullet (réaction b_1 , b_2 et b_3).

Les expériences de sulfoxydation réalisées dans l'eau marquée ($H_2^{18}O$) ne forment jamais de sulfoxyde marqué. Cela suggère que s'il y a des échanges avec une molécule d'eau, ils sont lents.

Enfin, il est possible que le fer-peroxyde puisse aussi directement oxyder le sulfure (réaction d). Dans ce cas tout le sulfoxyde sera marqué ^{18}O si le peroxyde d'hydrogène initial est marqué $H_2^{18}O_2$, et à aucun moment O_2 ne peut intervenir dans la réaction. Cette réaction ne

suffit pas à elle seule à expliquer les résultats des expériences de marquages isotopiques. Cependant nous ne pouvons pas exclure qu'elle se déroule en parallèle d'une des autres réactions décrites ci-dessus (réaction b₁, b₂ et b₃).



Ainsi plusieurs mécanismes de sulfoxydation peuvent être envisagés pour expliquer les expériences de marquages isotopiques et il est d'ailleurs possible que plusieurs de ces mécanismes se déroulent en parallèle.

Cependant, du fait de la présence de Tris et d'éthanol dans le milieu qui sont de très bon piègeurs de HO[•], nous pouvons penser que c'est majoritairement l'espèce Fe⁴⁺=O qui est responsable de l'oxydation à deux électrons du thioanisole en sulfoxyde. Cela est aussi en accord avec la formation de Fe²⁺ en fin de réaction (b₃). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que l'espèce Fe³⁺-OOH subisse une cassure homolytique de la liaison O-O. Cela supporte le fait que le site actif du mutant K48I puisse former des espèces fer-oxo à haut degré d'oxydation.

En fin de réaction d'oxydation du thioanisole, il a été observé que toute la protéine est Fe²⁺ (Figure 98). Dans les hypothèses présentées ci-dessus, seule la réaction b₃ peut expliquer la formation de Fe²⁺ en fin de réaction, toutes les autres réactions forment du Fe³⁺. Cependant, nous avons observé que indépendamment de la réaction avec le thioanisole le mutant K48I Fe³⁺ peut être réduit par H₂O₂ (cf. Annexe 8). Ainsi, après 10 min de réaction, la formation de SOR Fe²⁺, peut résulter de plusieurs réactions qui ont lieu en parallèle. La sulfoxydation du thioanisole et la réduction du mutant K48I Fe³⁺ par H₂O₂ qui n'a pas conduit à la formation de sulfoxyde. Cela pourrait expliquer que la formation de sulfoxyde est sous-stoechiométrique par rapport à la quantité de Fe³⁺ et de H₂O₂ initiale.

4. Conclusion sur la réaction entre la SOR K48I et O₂^{•-}

Ces données permettent à présent de mieux comprendre les données de radiolyse pulsée sur la réactivité du mutant K48I avec le superoxyde. Pour la réaction de la SOR sauvage avec le superoxyde, les données de radiolyse pulsée et de cristallographies mettent en évidence le rôle de la lysine 48 dans la protonation de l'oxygène proximal de l'intermédiaire Fe³⁺-OOH conduisant à la cassure de la liaison Fe-O permettant la formation de H₂O₂ et de Fe³⁺. En absence de la lysine 48, la réaction avec le superoxyde, forme également un

intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ qui cependant évolue vers une espèce Fe^{2+} sans production de H_2O_2 . Nous pouvons à présent proposer qu'en absence de la lysine 48 dans le mutant K48I, l'espèce Fe-OOH se clive au niveau de la liaison O-O pour former une espèce fer-oxo à haut degré d'oxydation. Cette entité réagirait avec une espèce organique présente dans le milieu, tel le formiate nécessaire à la radiolyse ou le tampon et évoluerait vers une espèce Fe^{2+} . Cette hypothèse est appuyée par les expériences d'oxydation du thioanisole, qui montrent que le site actif de la SOR K48I semble capable de former des espèces de type $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$. Nous proposons ainsi le schéma suivant pour la réaction du mutant K48I avec $\text{O}_2^{\bullet-}$:

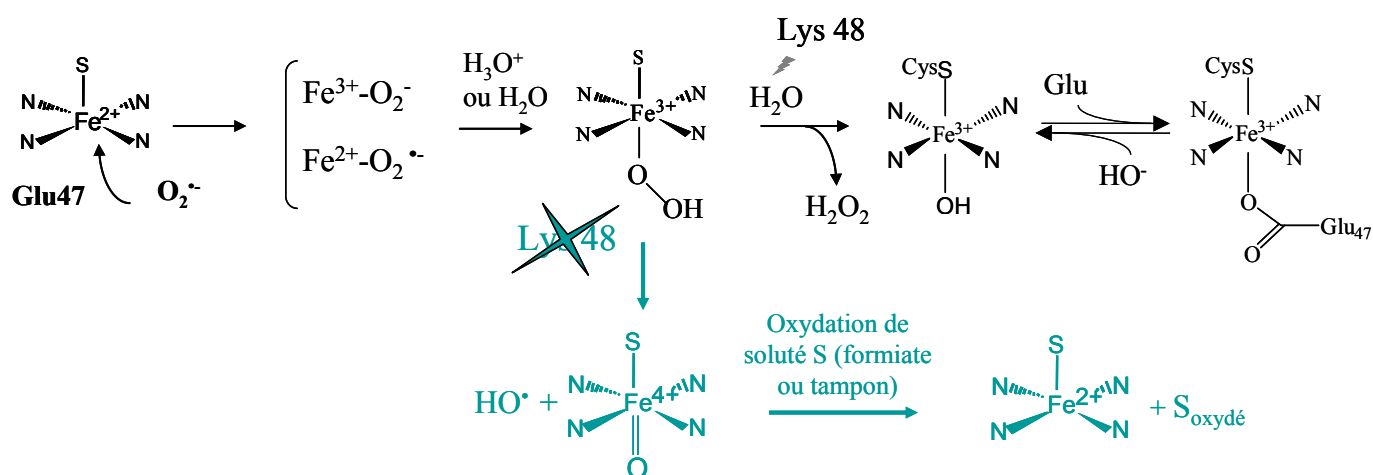


Figure 105 : Schéma du mécanisme réactionnel de la SOR avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ en présence ou non de la lysine 48.

5. Oxydation énantiosélective

Nous avons regardé si le mutant SOR K48I peut conférer une certaine énantiosélectivité lors de la réaction d'oxydation du thioanisole en sulfoxyde. L'expérience de sulfoxydation décrite précédemment (Figure 98) est répétée. Le produit de la réaction est alors injecté en GC munit d'une colonne chirale capable de séparer les énantiomères. Les résultats montrent que les deux énantiomères R et S du sulfoxyde sont formés dans les mêmes quantités. Cela montre que dans ces conditions, la réaction d'oxydation n'est pas énantiosélective. Cependant, les expériences de marquage ^{18}O (Figure 100, Figure 101 et Figure 102) ont mis en évidence que le dioxygène pouvait intervenir dans ces réactions d'oxydation en réagissant avec un radical S^\bullet intermédiaire. Cette réaction n'est pas énantiosélective. Nous avons donc répété l'expérience en milieu anaérobie, sous atmosphère d'azote, afin d'être sûr que l'oxydation du sulfure provienne uniquement de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$.

OOH. De nouveaux, les deux énantiomères R et S du sulfoxyde sont formés dans les mêmes proportions. Ces résultats suggèrent que le site actif de la SOR en étant très exposé au solvant et peu encombré, n'est pas capable d'induire préférentiellement la formation d'un énantiomère par rapport à l'autre.

6. Réaction d'oxydation du thioanisole avec le mutant E47A

Les données de résonance Raman ont montré que la SOR E47A oxydée ou réduite en présence d'un léger excès de H_2O_2 peut former et stabiliser une espèce Fe^{3+} -peroxo au niveau de son site actif (Mathé et coll, 2006). Afin d'étudier les propriétés oxydantes de cette espèce, les expériences précédentes de sulfoxydation du thioanisole ont été répétées avec le mutant SOR E47A.

100 μM de SOR E47A sont mis à réagir avec 100 μM de H_2O_2 dans 100 μL contenant 3 mM thioanisole, 0.4 M d'éthanol et 10 mM Tris/HCl pH 8.5. La quantité de méthyl phényl sulfoxyde formée est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont les suivants :

mélange initial				produits finaux	
	SOR	H ₂ O ₂	thioanisole	sulfoxyde	SOR
b	E47A Fe ³⁺ 100 μM	100 μM	3 mM	55 μM	Fe ³⁺ 60 μM / Fe ²⁺ 35 μM
c	E47A Fe ³⁺ 100 μM	/	3 mM	0 μM	Fe ³⁺ 100 μM
d	/	100 μM	3 mM	0 μM	/
e	E47A Fe ³⁺ 100 μM	1 mM	3 mM	50 μM	Fe ³⁺ 55 μM / Fe ²⁺ 30 μM
f	E47A Fe ²⁺ 100 μM	100 μM	3 mM	0 μM	Fe ²⁺ 100 μM

Figure 106 : Réactions de sulfoxydation du thioanisole en présence du mutant SOR E47A de *D. baarsii* et de H_2O_2 dans 0.4 M d'éthanol, 10 mM Tris/HCl pH 8.5. Temps de réaction 10 min à T ambiante, en aérobie. Les données représentent la moyenne d'au minimum 2 expériences indépendantes.

Tout comme pour la SOR K48I, une réaction de sulfoxydation est observée lorsque la SOR E47A est sous forme Fe^{3+} initialement (Figure 106 ligne a et e). De même, la réaction de sulfoxydation n'est observée que lorsque la SOR E47A Fe^{3+} et H_2O_2 sont en présence (Figure 106 ligne a, b et e). Lorsque la concentration de H_2O_2 est augmentée progressivement jusqu'à 10 équivalents par rapport à la SOR (ajout de 1 éq. toutes les minutes sur 10 min), il n'y a pas d'augmentation significative du sulfoxyde formé (Figure 106 ligne d). La réaction n'est donc pas catalytique. La quantité de sulfoxyde formée est comparable à celle formée dans les mêmes conditions par le mutant SOR K48I (Figure 98, ligne a et Figure 106, ligne a).

Ces expériences nous montrent que la SOR E47A Fe^{3+} en présence de H_2O_2 est capable de former des espèces pouvant oxyder le thioanisole en méthyl phényl sulfoxyde. La variation de l'absorbance au cours de la réaction a été suivie par UV visible. La bande d'absorbance à 560 nm, correspondant au Centre II oxydé diminue au cours de la réaction jusqu'à atteindre un plateau lorsque 50 % de la protéine est réduite. 50% de la protéine est donc sous forme Fe^{3+} en fin de réaction. Si du chlorure d'iridium est ajouté dans la solution, l'intensité de la bande à 560 nm initiale réapparaît à 90 %. La protéine n'est pas détruite, environ 40% de la SOR est sous forme Fe^{2+} en fin de réaction. Notons que bien qu'en fin de réaction une partie de la SOR E47A est Fe^{3+} , la sulfoxydation n'est pas catalytique.

De même que pour la SOR K48I, la détection de HO^\bullet par RPE a été réalisée de manière similaire à celle présentée dans la Figure 104 et aucun HO^\bullet n'a été détecté au cours de la réaction de la SOR E47A Fe^{3+} avec H_2O_2 en présence de DMPO. Il est possible que l'espèce réalisant l'oxydation du thioanisole soit différente dans le cas du mutant E47A par rapport à K48I. Il pourrait s'agir directement du $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ou d'une espèce $\text{Fe}^{5+}=\text{O}$.

De même que pour la SOR K48I, l'énantiosélectivité de la réaction de sulfoxydation du thioanisole par E47A et H_2O_2 a été étudiée. La même expérience que celle décrite précédemment est réalisée, avec une injection en GC sur colonne chirale. La même quantité de chacun de deux énantiomères est détectée. L'oxydation n'est donc pas asymétrique. Etant donné que le mutant E47A ne présente pas plus d'encombrement stérique autour du site actif que le mutant K48I ce résultat n'est pas surprenant.

En conclusion, la SOR qui est impliquée dans des processus de détoxification du radical superoxyde, a la capacité remarquable de former des entités de type fer-peroxyde au cours de son cycle catalytique. Ces intermédiaires fer-peroxyde sont bien connus pour être à l'origine des propriétés d'oxydation des oxygénases et des catalyseurs biomimétiques. Nous avons montré que le mutant SOR K48I, en modifiant la réactivité de l'intermédiaire Fe^{3+} -peroxyde, permet à la protéine de réaliser une réaction d'oxydation du thioanisole en méthyl phényl sulfoxyde. Ce type d'oxydation à 2 électrons pour un centre FeN_4S_1 non hémunique est tout à fait remarquable. En effet, une espèce $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ dans un site actif de ce type (FeN_4S_1) est connue pour réaliser l'arrachement d'atome d'hydrogène (oxydation à 1 électron) et non le transfert d'un atome d'oxygène (oxydation à 2 électrons) (Bukowski et coll, 2005). Cette

étude n'est cependant qu'un point de départ et il sera intéressant de déterminer les propriétés d'oxydations de la SOR vis-à-vis de différents substrats (phosphine, alcools, alcanes), en relation avec différentes mutations du site actif susceptibles de modifier la réactivité de l'intermédiaire fer-peroxyde (mutant E114A par exemple). Enfin, même si le site actif de la SOR ne semble pas conférer une énantiosélectivité, il serait intéressant de voir si des mutations dirigées induisant un encombrement spatial proche du site actif, ne favoriseraient pas la formation d'un énantiomère par rapport à l'autre. Notons que l'accessibilité du site actif de la SOR, en surface de la protéine, offre d'importantes perspectives vis-à-vis de nombreux substrats. La possibilité d'en contrôler la sélectivité par mutagenèse dirigée de résidus de surfaces proches du site actif ouvrirait la perspective d'utiliser la SOR comme un nouveau type de catalyseur d'oxydation.

Chapitre V :
**Etudes préliminaires sur d'autres
propriétés du site actif de la SOR**

I. Activité catalase du site actif de la SOR

De façon étonnante, nous avons mis en évidence que le site actif de la SOR de *D. baarsii* possède une activité catalase. En effet, la réaction de la SOR avec un excès de H_2O_2 produit une quantité importante de dioxygène. Nous avons étudié cette réaction à l'aide d'une électrode de Clark, qui permet de suivre la formation du dioxygène au cours de la réaction. Lorsque 500 μM de H_2O_2 sont mis à réagir avec différentes concentrations de SOR sauvage dans 1 mL d'une solution contenant 2 mM de Tris/HCl pH 8.5 et dégazée sous azote, environ 250 μM de dioxygène sont formés, soit la moitié de la quantité de H_2O_2 initiale. En fin d'expérience, le dosage de H_2O_2 par la méthode HRP/LCV, montre que tout H_2O_2 a réagi (Figure 107 et Figure 108).

	réactifs initiaux		produits finaux		
	SOR	H_2O_2	O_2	SOR	H_2O_2
a	WT Fe^{3+} 50 μM	500 μM	230 μM	Fe^{3+} 33 μM / Fe^{2+} 5 μM	0 μM
b	WT Fe^{3+} 30 μM	500 μM	243 μM	Fe^{3+} 13 μM / Fe^{2+} 13 μM	0 μM
c	/	500 μM	35 μM	/	420 μM
d	WT Fe^{3+} 80 μM	/	0 μM	Fe^{3+} 80 μM	/
e	E47A Fe^{3+} 80 μM	500 μM	246 μM	Fe^{3+} 50 μM / Fe^{2+} 15 μM	0 μM
g	K48I Fe^{3+} 80 μM	500 μM	50 μM	Fe^{2+} 80 μM	400 μM

Figure 107 : Réaction la SOR de *D. baarsii* avec H_2O_2 . O_2 produit est détecté par électrode de Clark, dans 2 mM Tris/HCl pH 8.5 à 25 °C.

Si la même expérience est réalisée en absence de SOR, une production de O_2 d'environ 35 μM est mesurée sur 10 min correspondant à la dismutation spontanée de H_2O_2 à ce pH (Figure 107 ligne c). En absence de H_2O_2 , aucune formation de dioxygène n'est observée. Ces résultats montrent que la SOR sauvage est capable de catalyser une dismutation de H_2O_2 , et présente donc une activité de type catalase.

Nous avons testé l'activité catalase des mutants E47A et K48I dans les mêmes conditions que la SOR sauvage. Le mutant E47A possède une activité catalase similaire à celle de la SOR sauvage (Figure 107 ligne e et Figure 108), alors que le mutant SOR K48I ne possède aucune activité catalase (Figure 107 ligne g).

En fin d'expérience la SOR sauvage comme le mutant E47A a été partiellement dégradée. Dans les deux cas, la protéine se trouve majoritairement sous forme oxydée.

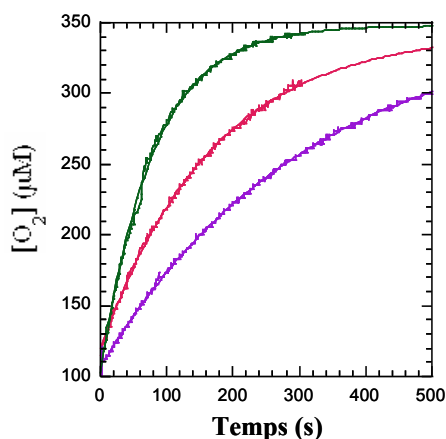
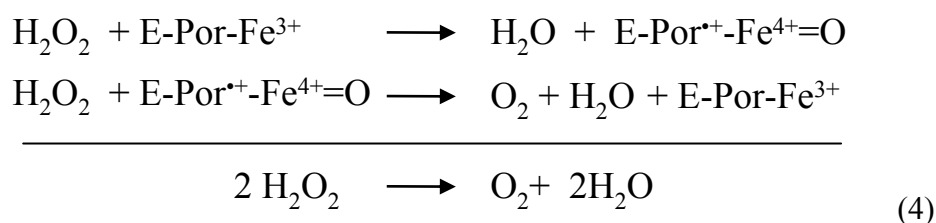


Figure 108 : Formation d'O₂ au cours de la réaction de la SOR sauvage (30 μM en **violet** et 50 μM en **rose**) et de son mutant E47A (80 μM en **vert**) avec H₂O₂ (500 μM) dans 10 mM Tris/HCl pH 8.5 mesuré par électrode de Clark.

La cinétique de formation de O₂ nous permet de déterminer une activité catalase spécifique. L'activité spécifique (AS) est de 0.199 U/mg de SOR pour la SOR sauvage, cette activité est très similaire à celle déterminée pour le mutant E47A (0.194 U/mg de SOR) Une Unité enzymatique correspond à la dismutation de 1 μmol de H₂O₂ par minute. Notons que cette activité catalase pour la SOR est faible. La catalase de foie de bœuf commerciale présente une activité de 10 000 U/ mg de protéine.

Ces résultats montrent néanmoins que l'activité catalase observée est bien due au site actif de l'enzyme et non pas au Centre I. En effet, la mutation de résidus proches de ce site actif tel que la lysine 48 en change la réactivité (Figure 107 ligne g).

L'activité catalase tel que cela a été décrit pour les enzymes hémiques peut se décomposer en 2 demi-équations centrées sur le fer permettant la dismutation de H₂O₂ (Alfonso-Prieto et coll, 2009). Dans une 1^{ère} étape, H₂O₂ est réduit à 2 électrons, et dans un second temps H₂O₂ est oxydé à 2 électrons. Ces réaction à deux électrons se font grâce à la capacité de la catalase à former des intermédiaires réactionnel de type radical porphyrinile Fe⁴⁺-oxo (E-por^{•+}-Fe⁴⁺=O) durant le cycle catalytique.



L'activité catalase de la SOR doit donc correspondre à des réactions de transfert à deux électrons du fer avec H_2O_2 . Cela suppose que le fer de la SOR initialement Fe^{3+} doit passer par des espèces à haut degré d'oxydation pour former cette catalyse de dismutation de H_2O_2 . Dans la partie précédente nous avons montré que le mutant K48I était capable de former au sein de son site actif des espèces de type $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ contrairement à la SOR sauvage. Pourtant ce mutant SOR K48I ne possède pas d'activité catalase. Est-il possible que l'activité catalase pour la SOR sauvage et le mutant E47A, se fasse en passant par des espèces de type Fe^{5+} ? Le mutant E47A est également capable de réaliser des réactions de sulfoxydation (cf. Chapitre IV Partie IV.C) mais il ne semble pas former de HO^\bullet . Il est donc possible que l'espèce qui réalise l'oxydation du thioanisole pour le mutant E47A soit un fer-oxo différent que celui qui se forme dans le mutant K48I. Ces expériences sont des expériences préliminaires, il serait maintenant intéressant de voir sur quel couple redox se fait l'activité catalase, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{4+}$? Ou $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{5+}$?

II. Oxydation au cérium

Les mutants K48I et E47A peuvent réaliser des réactions d'oxydation, comme celle du thioanisole en méthyl phényl sulfoxyde, en présence de H_2O_2 comme oxydant. Qu'en est-il avec d'autres oxydants forts, non donneurs d'oxo comme le cérium ? Le cérium est un oxydant plus puissant que H_2O_2 et il a été montré que certains complexes de fer en présence de cérium (IV) pouvaient former des espèces fer-oxo qui catalysent des réactions d'oxydation de substrat organiques (Lee et coll, 2009).

L'oxydation au cérium (IV) du mutant E47A Fe^{2+} dans un milieu sans tampon, induit l'apparition d'une bande UV-visible présentant un maximum d'absorption à 690 nm, décalée de 46 nm par rapport à de la bande à 644 nm attendue pour le site actif oxydé Fe^{3+} .

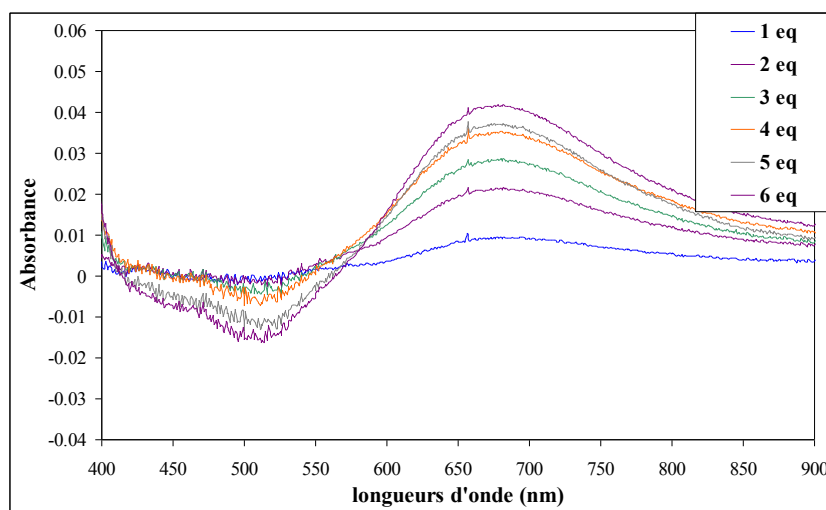


Figure 109 : Spectre d'absorption du mutant E47A Fe^{2+} ($90 \mu\text{M}$) dans l'eau (sans tampon) après ajouts successifs de 1 à 6 équivalents molaires de cérium (Cérium IV). Le spectre du Centre I a été soustrait.

Cette bande présente un epsilon faible d'environ $500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, si nous considérons que toute la SOR E47A présente a été oxydée. Nous remarquons qu'au delà de 4 équivalents de cérium, le Centre I de la SOR E47A commence à se dénaturer légèrement (bande négative à 503 nm). L'ajout de tampon 50 mM Tris/HCl pH 7.6 fait disparaître totalement cette bande à 690 nm .

Cette bande à 690 nm est très similaire à celle du complexe $[(\text{N}_4\text{Py})\text{Fe}^{4+}(\text{O})]^{2+}$, formé par réaction du complexe $[(\text{N}_4\text{Py})\text{Fe}^{2+}] (\text{ClO}_4)_2$ avec 4 équivalents de cérium IV, qui présente une bande d'absorption UV-visible à 690 nm avec un epsilon d'environ $470 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Lee et coll, 2009). Ces données montrent qu'il y a formation d'une espèce de type $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, non hémique, après utilisation d'eau comme source d'oxygène et le cérium comme oxydant. Ces données suggèrent que la bande observée à 690 nm pour la SOR (Figure 109) peut être caractéristique de la formation d'une espèce fer-oxo.

Afin de savoir si l'oxydation de la SOR E47A au cérium IV forme une espèce fer-oxo, un spectre Mössbauer a été réalisé. Le Mössbauer est une technique qui permet de visualiser l'ensemble du fer présent dans une solution ainsi que son état d'oxydation. Cette technique peut aussi apporter quelques indications sur la coordination du fer. Seul l'isotope de fer 57 peut être détecté par la spectroscopie Mössbauer. Une purification du mutant E47A de la SOR de *D. baarsii* identique à celle décrite dans Matériel et Méthode a été réalisée en présence de $50 \mu\text{M}$ de $^{57}\text{FeCl}_3$ dans le milieu de culture M9. La SOR E47A purifiée à partir de ces cultures est métallée à 100% ^{57}Fe .

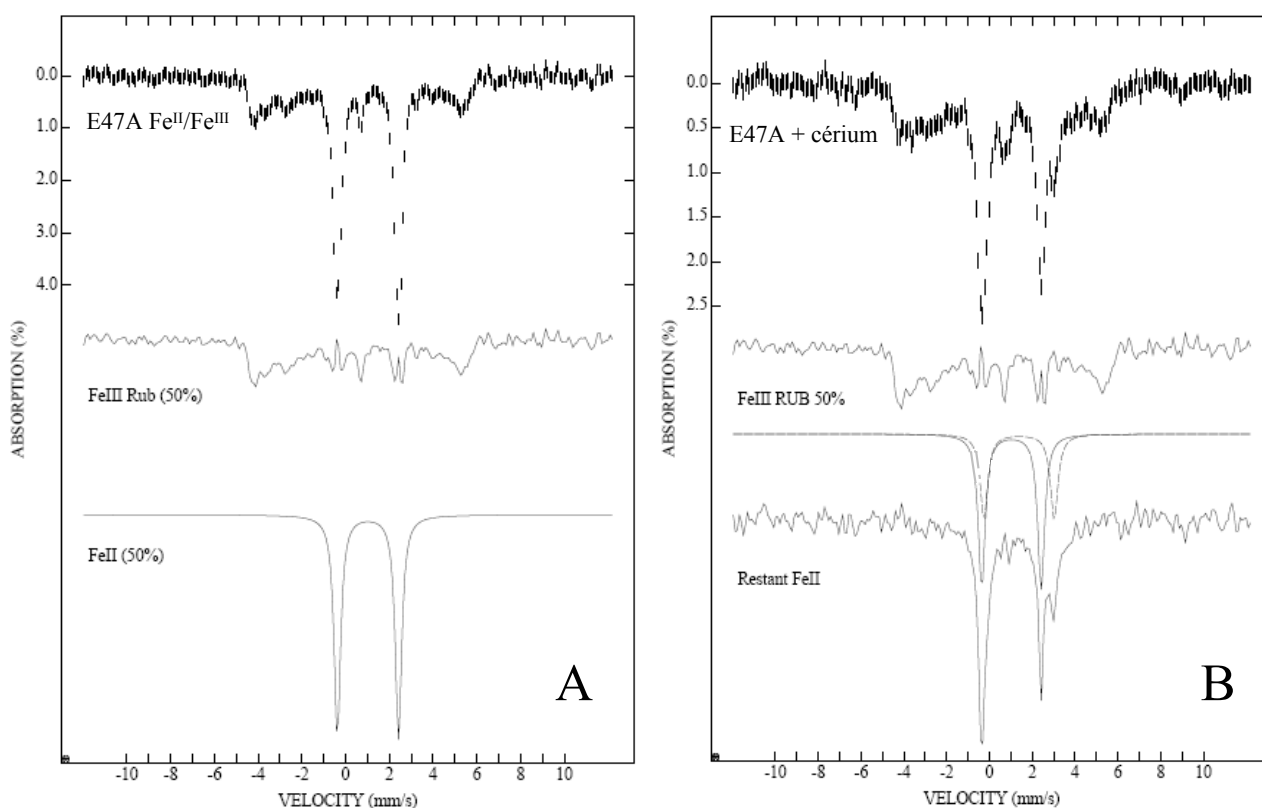


Figure 110 : Spectres Mössbauer bruts et sous-spectres du Centre I et du Centre II du mutant SOR E47A (A) semi oxydé (B) après réaction avec 3.5 éq. de cérium IV. Le Centre I est soustrait pour permettre l'observation du fer du site actif. Le signal du site actif ayant réagi avec le cérium peut être simulé par 2 doublets. Un doublet correspondant au Fe^{2+} de départ qui n'a pas changé (δ 1.03 ΔEq 2.79 W 0.39) à 29% (ligne pleine) et un nouveau doublet Fe^{2+} (δ 1.38 ΔEq 3.28 W 0.42) à 17% (ligne pointillée).

Les données de spectroscopie Mössbauer sur l'échantillon du mutant E47A oxydé avec 3.5 équivalents de cérium nous montrent que tout le fer du site actif est sous forme Fe^{2+} dans cette préparation. De plus bien que 58% du site actif est dans un état Fe^{2+} identique à celui de la protéine non traité au cérium, 34% du fer du site actif de la protéine est dans un état Fe^{2+} différent de l'état initial. L'échantillon Mössbauer est décongelé et un spectre UV-visible est réalisé. La protéine est dénaturée et l'allure de son spectre d'absorption n'est plus représentative des deux centres à fer de la SOR. Cette altération peut être due au traitement au cérium. Il est possible que le site actif de ce mutant soit passé par un haut degré d'oxydation instable, comme un fer-oxo qui a évolué vers un Fe^{2+} en oxydant la protéine (aucune autre molécule n'est présente dans le milieu puisque la protéine est dans l'eau sans tampon). Une analyse par spectrométrie de masse est alors réalisée sur cet échantillon afin de détecter s'il y a eu des oxydations de la chaîne polypeptidique.

L'échantillon est analysé par spectrométrie de masse en mode électrospray en conditions dénaturantes, qui peut révéler les possibles altérations de la masse de la chaîne

polypeptidique de la SOR. L'échantillon présente une masse majoritaire, à 13966Da, correspondant à la valeur attendue pour la masse de la chaîne polypeptidique du mutant E47A. Un autre pic est présent à 13999 Da, soit 33 Da supplémentaires. Cela peut correspondre à une addition de 2 atomes d'oxygènes sur la chaîne polypeptidique de la SOR. Enfin, deux autres pics plus faibles que les deux premiers sont également présents à 13980 Da, 13986 Da soit à 14 et 20 Da supplémentaires. L'ajout de 14 Da peut correspondre à une addition d'un atome d'oxygène et à la perte de 2 atomes d'hydrogène sur la chaîne polypeptidique. Ces données démontrent que la protéine a subi des oxydations, suggérant fortement qu'une espèce oxydante instable s'est formée dans le milieu. Il est possible qu'un s'agisse d'une espèce fer-oxo.

Il serait intéressant d'étudier la réaction du mutant E47A oxydé par le cérium avec des substrats tels que le thioanisole et de quantifier la présence de méthyle phényl sulfoxyde en fin de réaction.

Il semble donc que le site actif de la SOR soit capable de former des espèces à haut degré d'oxydation. Cependant ces espèces sont très oxydantes et peu stables et pour le moment nous n'avons pas réussi à les piéger afin de mieux les caractériser.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Les SORs de classe 1, telle celle de *D. baarsii*, possèdent un autre centre à fer en plus du site actif, le Centre I. Ce centre ne réagit pas avec le superoxyde. Dans ce travail de thèse nous avons mis en évidence une des fonctions de ce centre. Le Centre I possède une structure classique $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ que nous retrouvons chez plusieurs petites protéines de transfert d'électrons, telles les désulforédoxines ou rubrédoxines. Pour son activité catalytique la SOR nécessite des partenaires physiologiques comme donneurs d'électrons (réductases cellulaires). Nous avons montré que le Centre I peut jouer un rôle de relais électronique entre les réductases et le site actif de la SOR. Cependant, ce transfert d'électron entre le Centre I et le site actif ne se fait pas de façon intramoléculaire mais intermoléculaire, entre deux molécules de SOR. L'importance du Centre I dans la réduction de la SOR dépend de la nature de ces réductases. Nous proposons que la présence de ce centre permette à la SOR de s'adapter à une très large gamme de réductases cellulaires afin de présenter une activité superoxyde réductase optimale quelques soit les réductases présentes dans la cellule.

Le mécanisme de réduction du superoxyde par la SOR a été très étudié par la technique de radiolyse pulsée. Nous montrons que les études antérieures sur la SOR de *D. baarsii* ont été perturbées par un phénomène photochimique, résultant d'une propriété particulière d'un des intermédiaires réactionnels du cycle catalytique. Les études du mécanisme de la SOR ont été reprises en absence de cet effet photochimique et nous ont permis de proposer un nouveau mécanisme réactionnel de réduction du superoxyde par la SOR de *D. baarsii* (Figure 111). Les données obtenues suggèrent que les mécanismes enzymatiques des différentes SORs peuvent être, au final, très similaires. Cela est en accord avec la forte homologie de séquence et de structure de leurs sites actifs.

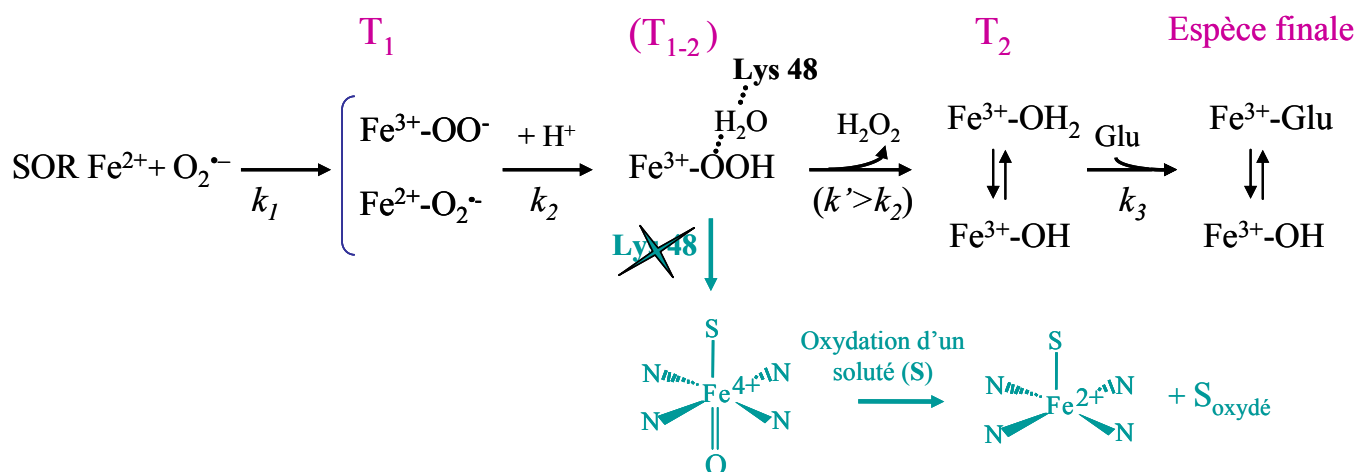


Figure 111 : Schéma du mécanisme réactionnel de la SOR avec H_2O_2 en présence ou non de la lysine 48.

L'étude du mutant SOR K48I a permis de mettre en évidence le rôle essentiel que joue la lysine 48 dans la réduction du superoxyde par la SOR. Au cours du cycle catalytique, cette lysine est primordiale pour la protonation de l'intermédiaire fer-hydroperoxyde, elle permet la libération de H_2O_2 et la formation de l'espèce SOR-Fe^{3+} finale. Nous avons montré que la mutation de la lysine 48 entraîne une modification profonde de la réactivité de l'intermédiaire Fe^{3+} -hydroperoxyde de la SOR. Nos données suggèrent fortement qu'en absence de cette lysine, l'intermédiaire Fe^{3+} -hydroperoxyde évolue vers une espèce à haut degré d'oxydation de type fer-oxo, fortement oxydante. Ainsi, la lysine 48 apparaît comme un résidu essentiel, qui permet à la SOR d'orienter l'évolution de l'intermédiaire Fe^{3+} -hydroperoxyde vers la production de H_2O_2 , plutôt que vers la formation d'entités de type fer-oxo à haut degré d'oxydation, comme le font les oxygénases de type cytochrome P450 (Figure 111).

Bien que naturellement la SOR soit impliquée dans des processus de détoxification du radical superoxyde, elle a la capacité remarquable de former des entités de type fer-peroxyde au cours de son cycle catalytique, tout comme les enzymes catalysant des réactions d'oxygénation. Nous avons étudié les propriétés oxydantes des Fe^{3+} -peroxydes formés au sein du site actif de la SOR de *D. baarsii* et de certains de ces mutants. Ces études ont permis de mettre en évidence que des mutations de résidus appartenant à la seconde sphère de coordination du fer, comme la lysine 48 mais également le Glutamate 47, entraînent une modification profonde de la réactivité de l'espèce Fe^{3+} -peroxyde formée au sein de la SOR. Ces mutants de la SOR sont en effet capables de réaliser des réactions d'oxydation

spécifiques, telle la transformation de thioanisole en méthyl phényl sulfoxyde, en présence de H_2O_2 .

Une suite intéressante à ce travail serait de continuer l'étude du contrôle de la réactivité de l'intermédiaire Fe^{3+} -peroxyde par des résidus bien définis du site actif. Il sera également intéressant de déterminer les propriétés d'oxydation de la SOR vis-à-vis de différents substrats (phosphine, alcools, alcanes), en relation avec différentes mutations du site actif susceptibles de modifier la réactivité de l'intermédiaire fer-peroxyde. La compréhension de l'influence de ces différents résidus devrait permettre de mieux comprendre la réactivité des espèces Fe^{3+} -peroxyde et en particulier leur évolution ou non vers des entités encore plus oxydantes de type fer-oxo à haute valence. Par ailleurs, il serait intéressant de piéger les éventuels intermédiaires de type fer-oxo pouvant se former au site actif de la SOR et de les caractériser à l'aide des techniques spectroscopiques (Mössbauer, RPE, résonance Raman).

La compréhension de la réactivité du ce site actif unique FeN_4S_1 peut conduire à la mise au point de nouveaux biocatalyseurs d'oxydation. L'accessibilité de son site actif, en surface de la protéine, offre d'importantes perspectives vis-à-vis de nombreux substrats, tout en ayant la possibilité d'en contrôler la sélectivité par mutagenèse dirigée de résidus de surface proches du site actif.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- ABREU, I. A., SARAIVA, L. M., CARITA, J., HUBER, H., STETTER, K. O., CABELLI, D. et TEIXEIRA, M. (2000). Oxygen detoxification in the strict anaerobic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*: superoxide scavenging by neelaredoxin, *Molecular microbiology* **38**, 322-334.
- ABREU, I. A., SARAIVA, L. M., SOARES, C. M., TEIXEIRA, M. et CABELLI, D. E. (2001). The mechanism of superoxide scavenging by *Archaeoglobus fulgidus* neelaredoxin, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38995-39001.
- ADAM, V., ROYANT, A., NIVIERE, V., MOLINA-HEREDIA, F. P. et BOURGEOIS, D. (2004). Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction, *Structure* **12**, 1729-1740.
- ASCENSO, C., RUSNAK, F., CABRITO, I., LIMA, M. J., NAYLOR, S., MOURA, I. et MOURA, J. J. (2000). Desulfoferrodoxin: a modular protein, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**, 720-729.
- ALFONSO-PRIETO, M., BIARNES, X., VIDOSSICH, P., AND ROVIRA, C. (2009) The molecular mechanism of the catalase reaction, *Journal of the American Chemical Society* **131**, 11751-11761.
- ASLUND, F., ZHENG, M., BECKWITH, J. et STORZ, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6161-6165.
- AUBERT, C., LEROY, G., BIANCO, P., FOREST, E., BRUSCHI, M. et DOLLA, A. (1998). Characterization of the cytochromes C from *Desulfovibrio desulfuricans* G201, *Biochemical and biophysical research communications* **242**, 213-218.
- AUCHERE, F., PAULETA, S. R., TAVARES, P., MOURA, I. et MOURA, J. J. (2006). Kinetics studies of the superoxide-mediated electron transfer reactions between rubredoxin-type proteins and superoxide reductases, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 433-444.
- AUCHERE, F., RALEIRAS, P., BENSON, L., VENYAMINOV, S. Y., TAVARES, P., MOURA, J. J. G., MOURA, I. et RUSNAK, F. (2003). Formation of a stable cyano-bridged dinuclear iron cluster following oxidation of the superoxide reductases from *Treponema pallidum* and *Desulfovibrio vulgaris* with $K_3Fe(CN)_6$, *Inorganic Chemistry* **42**, 938-940.
- AUCHERE, F., SIKKINK, R., CORDAS, C., RALEIRAS, P., TAVARES, P., MOURA, I. et MOURA, J. J. G. (2004). Overexpression and purification of *Treponema pallidum* rubredoxin; kinetic evidence for a superoxide-mediated electron transfer with the superoxide reductase neelaredoxin, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **9**, 839-849.

B

- BABCOCK, G. T. (1999). How oxygen is activated and reduced in respiration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12971-12973.
- BAGG, A. et NEILANDS, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*, *Biochemistry* **26**, 5471-5477.

- BALLAND, V., BANSE, F., ANXOLABEHERE-MALLART, E., GHILADI, M., MATTIOLI, T. A., PHILOUZE, C., BLONDIN, G. et GIRERD, J. J. (2003). Fe(II) and Fe(III) mononuclear complexes with a pentadentate ligand built on the 1,3-diaminopropane unit. Structures and spectroscopic and electrochemical properties. Reaction with H₂O₂, *Inorganic Chemistry* **42**, 2470-2477.
- BECKMAN, J. S. et KOPPENOL, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly, *American Journal of Physiology* **40**, C1424-C1437.
- BENOV, L. et FRIDOVICH, I. (1999). Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on *Escherichia coli*. The transketolase connection, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 4202-4206.
- BENOV, L., KREDICH, N. M. et FRIDOVICH, I. (1996). The mechanism of the auxotrophy for sulfur-containing amino acids imposed upon *Escherichia coli* by superoxide, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 21037-21040.
- BERLETT, B. S. et STADTMAN, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *The Journal of biological chemistry* **272**, 20313-20316.
- BERNADOU, J., et MEUNIER, B. (1998). 'Oxo-hydroxo tautomerism' as useful mechanistic tool in oxygenation reactions catalysed by water-soluble metalloporphyrins, *Chemical Communications*, 2167-2173.
- BERTHOMIEU, C., DUPEYRAT, F., FONTECAVE, M., VERMEGLIO, A. et NIVIERE, V. (2002). Redox-dependent structural changes in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* and *Treponema pallidum* : a FTIR study, *Biochemistry* **41**, 10360-10368.
- BIELSKI, B. H. (1985). Fast kinetic studies of dioxygen-derived species and their metal complexes, *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **311**, 473-482.
- BIELSKI, B. H. J. et RICHTER, H. W. (1977). Study of superoxide radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation-induced oxygen-consumption, *Journal of the American Chemical Society* **99**, 3019-3023.
- BLASCHKOWSKI, H. P., NEUER, G., LUDWIGFESTL, M. et KNAPPE, J. (1982). Routes of flavodoxin and ferredoxin reduction in *Escherichia coli*. Coa-acylating pyruvate-flavodoxin and NADPH-flavodoxin oxidoreductases participating in the activation of pyruvate formate-lyase, *European Journal of Biochemistry* **123**, 563-569.
- BRIVIBA, K., KLOTZ, L. O. et SIES, H. (1997). Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems, *Biological Chemistry* **378**, 1259-1265.
- BRUNE, A., FRENZEL, P. et CYPIONKA, H. (2000). Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations, *Fems Microbiology Reviews* **24**, 691-710.
- BUKOWSKI, M. R., HALFEN, H. L., VAN DEN BERG, T. A., HALFEN, J. A. et QUE, L., JR. (2005). Spin-state rationale for the peroxo-stabilizing role of the thiolate ligand in superoxide reductase, *Angewandte Chemie* **44**, 584-587.
- BUKOWSKI, M. R., KOEHNTOP, K. D., STUBNA, A., BOMINAAR, E. L., HALFEN, J. A., MUNCK, E., NAM, W., AND QUE, L. (2005) A thiolate-ligated nonheme oxoiron(IV) complex relevant to cytochrome P450, *Science* **310**, 1000-1002.
- BUS, J. S. et GIBSON, J. E. (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity, *Environmental health perspectives* **55**, 37-46.

BUETTNER, G. R. (1987). Spin Trapping - Electron-Spin-Resonance Parameters of Spin Adducts, *Free Radical Biology and Medicine* **3**, 259-303.

C

CARLIOZ, A. et TOUATI, D. (1986). Isolation of superoxide-dismutase mutants in *Escherichia coli* - Is superoxide-dismutase necessary for aerobic life, *Embo Journal* **5**, 623-630.

CHANG, L. Y., SLOT, J. W., GEUZE, H. J. et CRAPO, J. D. (1988). Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide-dismutase in rat hepatocytes, *Journal of Cell Biology* **107**, 2169-2179.

CHEN, L., SHARMA, P., LE GALL, J., MARIANO, A. M., TEIXEIRA, M. et XAVIER, A. V. (1994). A blue non-heme iron protein from *Desulfovibrio gigas*, *European journal of biochemistry / FEBS* **226**, 613-618.

CHOUDHURY, S. B., LEE, J. W., DAVIDSON, G., YIM, Y. I., BOSE, K., SHARMA, M. L., KANG, S. O., CABELLI, D. E. et MARONEY, M. J. (1999). Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in *Streptomyces seoulensis* superoxide dismutase, *Biochemistry* **38**, 3744-3752.

CLAY, M. D., JENNEY, F. E., JR., HAGEDOORN, P. L., GEORGE, G. N., ADAMS, M. W. et JOHNSON, M. K. (2002). Spectroscopic studies of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase: implications for active-site structures and the catalytic mechanism, *Journal of the American Chemical Society* **124**, 788-805.

COELHO, A. V., MATIAS, P., FULOP, V., THOMPSON, A., GONZALEZ, A. et CARRONDO, M. A. (1997). Desulfoferrodoxin structure determined by MAD phasing and refinement to 1.9 angstrom resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS₄ centre with a square pyramidal FeSN₄ centre, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2**, 680-689.

COULTER, E. D., EMERSON, J. P., KURTZ, D. M. et CABELLI, D. E. (2000). Superoxide reactivity of rubredoxin oxidoreductase (desulfoferrodoxin) from *Desulfovibrio vulgaris*: a pulse radiolysis study, *Journal of the American Chemical Society* **122**, 11555-11556.

COULTER, E. D. et KURTZ, D. M. (2001). A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **394**, 76-86.

COVES, J., NIVIERE, V., ESCHENBRENNER, M. et FONTECAVE, M. (1993). NADPH-sulfite reductase from *Escherichia coli*. A flavin reductase participating in the generation of the free-radical of ribonucleotide reductase, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18604-18609.

CROSS, A. R., ERICKSON, R. W. et CURNUTTE, J. T. (1999). The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex, *The Biochemical journal* **341**, 251-255.

CYPIONKA, H. (2000). Oxygen respiration by *desulfovibrio* species, *Annual review of microbiology* **54**, 827-848.

D

DANIELS, M. et WIGG, E. (1966). Oxygen as a primary species in radiolysis of water, *Science* **153**, 1533-1534.

D'AUTREAUX, B. et TOLEDANO, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nature reviews* **8**, 813-824.

DELAUNAY, A., ISNARD, A. D. et TOLEDANO, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor, *Embo Journal* **19**, 5157-5166.

DENISOV, I. G., MAKRIS, T. M., SLIGAR, S. G. et SCHLICHTING, I. (2005). Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chemical reviews* **105**, 2253-2277.

DEY, A., JENNEY, F. E., JR., ADAMS, M. W., JOHNSON, M. K., HODGSON, K. O., HEDMAN, B. et SOLOMON, E. I. (2007). Sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy and density functional theory calculations on superoxide reductase: role of the axial thiolate in reactivity, *Journal of the American Chemical Society* **129**, 12418-12431.

DOLLA, A., FOURNIER, M. et DERMOUN, Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria, *Journal of biotechnology* **126**, 87-100.

E

EMERSON, J. P., CABELLI, D. E. et KURTZ, D. M., JR. (2003). An engineered two-iron superoxide reductase lacking the [Fe(SCys)₄] site retains its catalytic properties in vitro and in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3802-3807.

EMERSON, J. P., COULTER, E. D., CABELLI, D. E., PHILLIPS, R. S. et KURTZ, D. M., JR. (2002). Kinetics and mechanism of superoxide reduction by two-iron superoxide reductase from *Desulfovibrio vulgaris*, *Biochemistry* **41**, 4348-4357.

EMERSON, J. P., COULTER, E. D., PHILLIPS, R. S. et KURTZ, D. M., JR. (2003). Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle, *The Journal of biological chemistry* **278**, 39662-39668.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. et ZOLLNER, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free radical biology & medicine* **11**, 81-128.

EVELSON, P., TRAVACIO, M., REPETTO, M., ESCOBAR, J., LLESUY, S. et LISSI, E. A. (2001). Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **388**, 261-266.

F

FENTON, H. J. H. (1893). *Proc. Chem. Soc. London* **9**, 113.

FIESCHI, F., NIVIERE, V., FRIER, C., DECOUT, J. L. et FONTECAVE, M. (1995). The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*, *The Journal of biological chemistry* **270**, 30392-30400.

FINKELSTEIN, E., ROSEN, G. M., et RAUCKMAN, E. J. (1980). Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones, *Journal of the American Chemical Society* **102**, 4994-4999.

FINKELSTEIN, E., ROSEN, G. M., et RAUCKMAN, E. J. (1982). Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts, *Molecular Pharmacology* **21**, 262-265.

FLINT, D. H., TUMINELLO, J. F. et EMPTAGE, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 22369-22376.

FONTECAVE, M., ELIASSON, R. et REICHARD, P. (1987). NAD(P)H-flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free-radical of ribonucleotide reductase, *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12325-12331.

FORMAN, H. J. (2007). Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction, *Free radical biology & medicine* **42**, 926-932.

FOURNIER, M., AUBERT, C., DERMOUN, Z., DURAND, M. C., MOINIER, D. et DOLLA, A. (2006). Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis, *Biochimie* **88**, 85-94.

FRASER, C. M., NORRIS, S. J., WEINSTOCK, C. M., WHITE, O., SUTTON, G. G., DODSON, R., GWINN, M., HICKEY, E. K., CLAYTON, R., KETCHUM, K. A., SODERGREN, E., HARDHAM, J. M., MCLEOD, M. P., SALZBERG, S., PETERSON, J., KHALAK, H., RICHARDSON, D., HOWELL, J. K., CHIDAMBARAM, M., UTTERBACK, T., MCDONALD, L., ARTIACH, P., BOWMAN, C., COTTON, M. D., FUJII, C., GARLAND, S., HATCH, B., HORST, K., ROBERTS, K., SANDUSKY, M., WEIDMAN, J., SMITH, H. O. et VENTER, J. C. (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete, *Science* **281**, 375-388.

FRIDOVICH, I. (1986). Superoxide dismutases, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **58**, 61-97.

FUANGTHONG, M., ATICHARTPONGKUL, S., MONGKOLSUK, S. et HELMANN, J. D. (2001). OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology* **183**, 4134-4141.

FUJII, K. et HUENNEKE, F. M. (1974). Activation of methionine synthetase by a reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent flavoprotein system, *Journal of Biological Chemistry* **249**, 6745-6753.

G

GARDES-ALBERT, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., ABEDINZADEH, Z. et JORE, D. (2003). Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic?, *Actualite Chimique*, 91-96.

GELLER, B. L. et WINGE, D. R. (1982). Rat-liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Sub-cellular location in lysosomes, *Journal of Biological Chemistry* **257**, 8945-8952.

GIRERD, J. J., BANSE, F. et SIMAAN, A. J. (2000). Characterization and properties of non-heme iron peroxo complexes, *Structure and bonding* **97**, 145-177.

GOEPTAR, A. R., SCHEERENS, H. et VERMEULEN, N. P. E. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome-P450, *Critical Reviews in Toxicology* **25**, 25-65.

GONZALEZFLECHA, B. et DEMPTE, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen-peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **270**, 13681-13687.

GORT, A. S. et IMLAY, J. A. (1998). Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses, *Journal of Bacteriology* **180**, 1402-1410.

GROCE, S. L. et LIPSCOMB, J. D. (2005). Aromatic ring cleavage by homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Role of His₂₀₀ in the kinetics of interconversion of reaction cycle intermediates, *Biochemistry* **44**, 7175-7188.

GRUNDEN, A. A., JENNEY, F. E., MA, K. S., JI, M. Y., WEINBERG, M. V. et ADAMS, M. W. W. (2005). In vitro reconstitution of an NADPH-dependent superoxide reduction pathway from *Pyrococcus furiosus*, *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1522-1530.

H

HALLIWELL, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant, *Free radical research communications* **9**, 1-32.

HALLIWELL, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward?, *Biochemical Journal* **401**, 1-11.

HALLIWELL, B. et GUTTERIDGE, J. M. (1984). Role of iron in oxygen radical reactions, *Methods in enzymology* **105**, 47-56.

HALLIWELL, B. et GUTTERIDGE, J. M. C. (1986). Oxygen free-radicals and iron in relation to biology and medicine. Some problems and concepts, *Archives of biochemistry and biophysics* **246**, 501-514.

HATTA, A. et FREI, B. (1995). Oxidative modification and antioxidant protection of human low-density-lipoprotein at high and low-oxygen partial pressures, *Journal of Lipid Research* **36**, 2383-2393.

HEIDELBERG, J. F., SESHADRI, R., HAVEMAN, S. A., HEMME, C. L., PAULSEN, I. T., KOLONAY, J. F., EISEN, J. A., WARD, N., METHE, B., BRINKAC, L. M., DAUGHERTY, S. C., DEBOY, R. T., DODSON, R. J., DURKIN, A. S., MADUPU, R., NELSON, W. C., SULLIVAN, S. A., FOUTS, D., HAFT, D. H., SELENGUT, J., PETERSON, J. D., DAVIDSEN, T. M., ZAFAR, N., ZHOU, L. W., RADUNE, D., DIMITROV, G., HANCE, M., TRAN, K., KHOURI, H., GILL, J., UTTERBACK, T. R., FELDBLYUM, T. V., WALL, J. D., VOORDOUW, G. et FRASER, C. M. (2004). The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Nature Biotechnology* **22**, 554-559.

HENLE, E. S., LUO, Y. et LINN, S. (1996). Fe^{2+} , Fe^{3+} , and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated Fenton reactions, *Biochemistry* **35**, 12212-12219.

HILLMANN, F., FISCHER, R. J., SAINT-PRIX, F., GIRBAL, L. et BAHL, H. (2008). PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*, *Molecular microbiology* **68**, 848-860.

HUANG, V. W., EMERSON, J. P. et KURTZ, D. M., JR. (2007). Reaction of *Desulfovibrio vulgaris* two-iron superoxide reductase with superoxide: insights from stopped-flow spectrophotometry, *Biochemistry* **46**, 11342-11351.

I

IMLAY, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage, *Annual review of microbiology* **57**, 395-418.

IMLAY, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen, *Molecular microbiology* **59**, 1073-1082.

IMLAY, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, *Annual review of biochemistry* **77**, 755-776.

IMLAY, J. A. (2008). How obligatory is anaerobiosis?, *Molecular microbiology* **68**, 801-804.

J

JENKINS, C. M. et WATERMAN, M. R. (1994). Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase-activities, *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27401-27408.

JENNER, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease, *Annals of Neurology* **53**, S26-S36.

JENNEY, F. E., JR., VERHAGEN, M. F., CUI, X. et ADAMS, M. W. (1999). Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase, *Science* **286**, 306-309.

JOVANOVIĆ, T., ASCENSO, C., HAZLETT, K. R. O., SIKKINK, R., KREBS, C., LITWILLER, R., BENSON, L. M., MOURA, I., MOURA, J. J. G., RADOLF, J. D., HUYNH, B. H., NAYLOR, S. et RUSNAK, F. (2000). Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 28439-28448.

K

KATONA, G., CARPENTIER, P., NIVIERE, V., AMARA, P., ADAM, V., OHANA, J., TSANOV, N. et BOURGEOIS, D. (2007). Raman-assisted crystallography reveals end-on peroxide intermediates in a nonheme iron enzyme, *Science* **316**, 449-453.

KEELE, B. B., MCCORD, J. M. et FRIDOVIC, I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli*-B. A new manganese-containing enzyme, *Journal of Biological Chemistry* **245**, 6176-6181.

KEYER, K. et IMLAY, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13635-13640.

KITAGAWA, T., DEY, A., LUGO-MAS, P., BENEDICT, J. B., KAMINSKY, W., SOLOMON, E. et KOVACS, J. A. (2006). A functional model for the cysteine-ligated non-heme iron enzyme superoxide reductase (SOR), *Journal of the American Chemical Society* **128**, 14448-14449.

KLEIN, J. A. et ACKERMAN, S. L. (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration, *Journal of Clinical Investigation* **111**, 785-793.

KLUG, D., FRIDOVIC, I. et RABANI, J. (1972). Direct demonstration of catalytic action of superoxide dismutase through use of pulse radiolysis, *Journal of Biological Chemistry* **247**, 4839-42.

KOPPENOL W.H. (1989). Generation and thermodynamic properties of oxyradicals, *Focus on Membrane Lipid Oxidation* **I**, 1-13.

KOVACS, J. A. et BRINES, L. M. (2007). Understanding how the thiolate sulfur contributes to the function of the non-heme iron enzyme superoxide reductase, *Accounts of Chemical Research* **40**, 501-509.

KOVALEVA, E. G. et LIPSCOMB, J. D. (2007). Crystal structures of Fe²⁺ dioxygenase superoxo, alkylperoxo, and bound product intermediates, *Science* **316**, 453-457.

KURTZ, D. M. et COULTER, E. D. (2002). The mechanism(s) of superoxide reduction by superoxide reductases in vitro and in vivo, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **7**, 653-658.

KURTZ, D. M., JR. (2006). Avoiding high-valent iron intermediates: superoxide reductase and rubrerythrin, *Journal of inorganic biochemistry* **100**, 679-693.

L

- LAST, J. A., SUN, W. M. et WITSCHI, H. (1994). Ozone, NO, and NO₂: oxidant air pollutants and more, *Environmental health perspectives* **102**, 179-184.
- LAULHERE, J. P., LABOURE, A. M. et BRIAT, J. F. (1989). Mechanism of the transition from plant ferritin to phytosiderin, *Journal of Biological Chemistry* **264**, 3629-3635.
- LEE, J. W. et HELMANN, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation, *Nature* **440**, 363-367.
- LEE, Y. M., DHURI, S. N., SAWANT, S. C., CHO, J., KUBO, M., OGURA, T., FUKUZUMI, S. et NAM, W. (2009). Water as an oxygen source in the generation of mononuclear nonheme Iron(IV) Oxo complexes, *Angewandte Chemie* **48**, 1803-1806.
- LI, Z. Y. et DEMPSEY, B. (1994). SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. purification and interaction with DNA, *Journal of Biological Chemistry* **269**, 18371-18377.
- LIN, T. Y. (1999). G33D mutant thioredoxin primarily affects the kinetics of reaction with thioredoxin reductase. Probing the structure of the mutant protein, *Biochemistry* **38**, 15508-15513.
- LIN, I. J., GEBEL, E. B., MACHONKIN, T. E., WESTLER, W. M. et MARKLEY, J. L. (2003). Correlation between hydrogen bond lengths and reduction potentials in *Clostridium pasteurianum* rubredoxin, *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1464-1465.
- LIOCHEV, S. I. et FRIDOVICH, I. (1997). A mechanism for complementation of the sodA sodB defect in *Escherichia coli* by overproduction of the rbo gene product (desulfoferrodoxin) from *Desulfoarculus baarsii*, *The Journal of biological chemistry* **272**, 25573-25575.
- LIOCHEV, S. I., HAUSLADEN, A., BEYER, W. F. et FRIDOVICH, I. (1994). NADPH-ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the *soxrs* regulon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1328-1331.
- LIPPARD S.J. et BERG J.M (1994). Principles of bioinorganic chemistry, *University Science Books*.
- LOMBARD, M., FONTECAVE, M., TOUATI, D. et NIVIERE, V. (2000). Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity, *The Journal of biological chemistry* **275**, 115-121.
- LOMBARD, M., HOUEE-LEVIN, C., TOUATI, D., FONTECAVE, M. et NIVIERE, V. (2001). Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*: reaction mechanism and role of glutamate 47 and lysine 48 in catalysis, *Biochemistry* **40**, 5032-5040.
- LOMBARD, M., TOUATI, D., FONTECAVE, M. et NIVIERE, V. (2000). Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*, *The Journal of biological chemistry* **275**, 27021-27026.

M

- MATHE, C., MATTIOLI, T. A., HORNER, O., LOMBARD, M., LATOUR, J. M., FONTECAVE, M. et NIVIERE, V. (2002). Identification of iron(III) peroxo species in the active site of the superoxide reductase SOR from *Desulfoarculus baarsii*, *Journal of the American Chemical Society* **124**, 4966-4967.

- MATHE, C., NIVIERE, V., HOUEE-LEVIN, C. et MATTIOLI, T. A. (2006). Fe^{3+} -eta(2)-peroxo species in superoxide reductase from *Treponema pallidum*. Comparison with *Desulfoarculus baarsii*, *Biophysical Chemistry* **119**, 38-48.
- MATHE, C., NIVIERE, V. et MATTIOLI, T. A. (2005). Fe^{3+} -Hydroxide ligation in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* is associated with pH dependent spectral changes, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 16436-16441.
- MATHE, C., WEILL, C. O., MATTIOLI, T. A., BERTHOMIEU, C., HOUEE-LEVIN, C., TREMEY, E. et NIVIERE, V. (2007). Assessing the role of the active-site cysteine ligand in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*, *Journal of Biological Chemistry* **282**, 22207-22216.
- McCORD, J. M. et FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), *The Journal of biological chemistry* **244**, 6049-6055.
- McCORD, J. M. et TURRENS, J. F. (1994). Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion, *Current Topics in Bioenergetics* **17**, 173-195.
- McIVER, L., LEADBEATER, C., CAMPOPIANO, D. J., BAXTER, R. L., DAFF, S. N., CHAPMAN, S. K. et MUNRO, A. W. (1998). Characterisation of flavodoxin NADP⁺ oxidoreductase and flavodoxin; key components of electron transfer in *Escherichia coli*, *European Journal of Biochemistry* **257**, 577-585.
- MEKMOUCHE, Y., HUMMEL, H., HO, R. Y. N., QUE, L., SCHUNEMANN, V., THOMAS, F., TRAUTWEIN, A. X., LEBRUN, C., GORGY, K., LEPRETRE, J. C., COLLOMB, M. N., DERONZIER, A., FONTECAVE, M., et MENAGE, S. (2002). Sulfide oxidation by hydrogen peroxide catalyzed by iron complexes: Two metal centers are better than one, *Chemistry-a European Journal* **8**, 1196-1204.
- MEMARIAN, H. R., MOHAMMADPOOR-BALTORK, I., AND BAHRAMI, K. (2006). Photoinduced electron transfer reactions of aryl benzyl sulfides promoted by 2,4,6-triphenylpyrilium tetrafluoroborate (TP^+BF_4^-), *Bulletin of the Korean Chemical Society* **27**, 106-110.
- MESSNER, K. R. et IMLAY, J. A. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10119-10128.
- MESSNER, K. R. et IMLAY, J. A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 42563-42571.
- MONGKOLSUK, S. et HELMANN, J. D. (2002). Regulation of inducible peroxide stress responses, *Molecular microbiology* **45**, 9-15.
- MOURA, I., HUYNH, B. H., HAUSINGER, R. P., LE GALL, J., XAVIER, A. V. et MUNCK, E. (1980). Mossbauer and EPR studies of desulforedoxin from *Desulfovibrio gigas*, *The Journal of biological chemistry* **255**, 2493-2498.
- MOURA, I., TAVARES, P., MOURA, J. J. G., RAVI, N., HUYNH, B. H., LIU, M. Y. et LEGALL, J. (1990). Purification and characterization of Desulfoferrodoxin. A novel protein from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC-27774) and from *Desulfovibrio vulgaris* (Strain Hildenborough) That contains a distorted rubredoxin center and a mononuclear ferrous center, *Journal of Biological Chemistry* **265**, 21596-21602.
- MUKHOPADHYAY, A., REDDING, A. M., JOACHIMIAK, M. P., ARKIN, A. P., BORGLIN, S. E., DEHAL, P. S., CHAKRABORTY, R., GELLER, J. T., HAZEN, T. C., HE, Q., JOYNER, D. C., MARTIN,

V. J. J., WALL, J. D., YANG, Z. K., ZHOU, J. et KEASLING, J. D. (2007). Cell-wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Journal of Bacteriology* **189**, 5996-6010.

MYER, Y. P., SATURNO, A. F., VERMA, B. C. et PANDE, A. (1979). Horse heart cytochrome-c. Oxidation-reduction potential and protein structures, *Journal of Biological Chemistry* **254**, 1202-1207.

N

NAGABABU, E. et RIFKIND, J. M. (2000). Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin, *Biochemical and biophysical research communications* **273**, 839-845.

NAMUSWE, F., KASPER, G. D., SARJEANT, A. A. N., HAYASHI, T., KREST, C. M., GREEN, M. T., MOENNE-LOCCOZ, P. et GOLDBERG, D. P. (2008). Rational tuning of the thiolate donor in model complexes of superoxide reductase: Direct Evidence for a *trans* Influence in Fe^{III}-OOR Complexes, *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14189-14200.

NIVIERE, V., ASSO, M., WEILL, C. O., LOMBARD, M., GUIGLIARELLI, B., FAVAUDON, V. et HOUÉE-LEVIN, C. (2004). Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*: identification of protonation steps in the enzymatic mechanism, *Biochemistry* **43**, 808-818.

NIVIERE, V., FIESCHI, F., DECOUT, J. L. et FONTECAVE, M. (1999). The NAD(P)H : Flavin oxidoreductase from *Escherichia coli* - Evidence for a new mode of binding for reduced pyridine nucleotides, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 18252-18260.

NIVIERE, V. et FONTECAVE, M. (2004). Discovery of superoxide reductase: an historical perspective, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **9**, 119-123.

NIVIERE, V., LOMBARD, M., FONTECAVE, M. et HOUÉE-LEVIN, C. (2001). Pulse radiolysis studies on superoxide reductase from *Treponema pallidum*, *FEBS letters* **497**, 171-173.

NOLLING, J., BRETON, G., OMELCHENKO, M. V., MAKAROVA, K. S., ZENG, Q. D., GIBSON, R., LEE, H. M., DUBOIS, J., QIU, D. Y., HITTI, J., WOLF, Y. I., TATUSOV, R. L., SABATHE, F., DOUCETTE-STAMM, L., SOUCAILLE, P., DALY, M. J., BENNETT, G. N., KOONIN, E. V., SMITH, D. R. et FINISHING, G. S. C. P. (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*, *Journal of Bacteriology* **183**, 4823-4838.

NUNOSHIBA, T., HIDALGO, E., CUEVAS, C. F. A. et DEMPLE, B. (1992). 2-Stage control of an oxidative stress regulon. The *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene, *Journal of Bacteriology* **174**, 6054-6060.

NUNOSHIBA, T., OBATA, F., BOSS, A. C., OIKAWA, S., MORI, T., KAWANISHI, S. et YAMAMOTO, E. (1999). Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34832-34837.

O

OKADO-MATSUMOTO, A. et FRIDOVICH, I. (2000). The role of alpha,beta-dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 34853-34857.

OUTTEN, C. E. et O'HALLORAN, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis, *Science* **292**, 2488-2492.

P

- PALENIK, B., BRAHAMSHA, B., LARIMER, F. W., LAND, M., HAUSER, L., CHAIN, P., LAMERDIN, J., REGALA, W., ALLEN, E. E., MCCARREN, J., PAULSEN, I., DUFRESNE, A., PARTENSKY, F., WEBB, E. A. et WATERBURY, J. (2003). The genome of a motile marine *Synechococcus*, *Nature* **424**, 1037-1042.
- PEREIRA, A. S., TAVARES, P., FOLGOSA, F., ALMEIDA, R. M., MOURA, I. et MOURA, J. J. G. (2007). Superoxide reductases, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2569-2581.
- PIANZZOLA, M. J., SOUBES, M. et TOUATI, D. (1996). Overproduction of the rbo gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* **178**, 6736-6742.
- PIERRE, J. L. et FONTECAVE, M. (1999). Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry, *Biometals* **12**, 195-199.
- PONG, K. (2003). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics, *Expert Opinion on Biological Therapy* **3**, 127-139.
- PRYOR, W. A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, *Annual review of physiology* **48**, 657-667.

R

- REDMOND, R. W. et KOCHEVAR, I. E. (2006). Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen, *Photochemistry and Photobiology* **82**, 1178-1186.
- REICHARD, P. (1993). The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 8383-8386.
- RODIONOV, D. A., DUBCHAK, I., ARKIN, A., ALM, E. et GELFAND, M. S. (2004). Reconstruction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing delta-proteobacteria, *Genome Biology* **5**, R90.
- RODRIGUES, J. V., ABREU, I. A., CABELLI, D. et TEIXEIRA, M. (2006). Superoxide reduction mechanism of *Archaeoglobus fulgidus* one-iron superoxide reductase, *Biochemistry* **45**, 9266-9278.
- RODRIGUES, J. V., ABREU, I. A., SARAIVA, L. M. et TEIXEIRA, M. (2005). Rubredoxin acts as an electron donor for neelaredoxin in *Archaeoglobus fulgidus*, *Biochemical and biophysical research communications* **329**, 1300-1305.
- RODRIGUES, J. V., SARAIVA, L. M., ABREU, I. A., TEIXEIRA, M. et CABELLI, D. E. (2007). Superoxide reduction by *Archaeoglobus fulgidus* desulfoferrodoxin: comparison with neelaredoxin, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **12**, 248-256.
- ROELFES, G., VRAJMASU, V., CHEN, K., HO, R. Y. N., ROHDE, J. U., ZONDERVAN, C., LA CROIS, R. M., SCHUDDE, E. P., LUTZ, M., SPEK, A. L., HAGE, R., FERLINGA, B. L., MUNCK, E. et QUE, L. (2003). End-on and side-on peroxo derivatives of non-heme iron complexes with pentadentate ligands: Models for putative intermediates in biological iron/dioxygen chemistry, *Inorganic Chemistry* **42**, 2639-2653.

S

- SANCAR, A. (1996). DNA excision repair, *Annual review of biochemistry* **65**, 43-81.

SANTOS-SILVA, T., TRINCAO, J., CARVALHO, A. L., BONIFACIO, C., AUCHERE, F., RALEIRAS, P., MOURA, I., MOURA, J. J. et ROMAO, M. J. (2006). The first crystal structure of class III superoxide reductase from *Treponema pallidum*, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 548-558.

SANYAL, I., COHEN, G. et FLINT, D. H. (1994). Biotin synthase: purification, characterization as a [2Fe-2S]cluster protein, and *in vitro* activity of the *Escherichia coli* bioB gene-product, *Biochemistry* **33**, 3625-3631.

SCHAFER, F. Q., WANG, H. P., KELLEY, E. E., CUENO, K. L., MARTIN, S. M. et BUETTNER, G. R. (2002). Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants, *Biological Chemistry* **383**, 671-681.

SCHLICHTING, I., BERENDZEN, J., CHU, K., STOCK, A. M., MAVES, S. A., BENSON, D. E., SWEET, R. M., RINGE, D., PETSKE, G. A. et SLIGAR, S. G. (2000). The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution, *Science* **287**, 1615-1622.

SCHWEITZER, C. et SCHMIDT, R. (2003). Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chemical reviews* **103**, 1685-1757.

SEEVER, L. C. et IMLAY, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* **183**, 7173-7181.

SEEVER, L. C. et IMLAY, J. A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide?, *The Journal of biological chemistry* **279**, 48742-48750.

SINGH, A. E. et ROMANOWSKI, B. (1999). Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features, *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 187-209.

SONO, M., ROACH, M. P., COULTER, E. D. et DAWSON, J. H. (1996). Heme-containing oxygenases, *Chemical reviews* **96**, 2841-2888.

STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T. E., KHOO, J. C. et WITZTUM, J. L. (1989). Beyond Cholesterol - Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *New England Journal of Medicine* **320**, 915-924.

STONE, J. R. et YANG, S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger, *Antioxidants & redox signalling* **8**, 243-270.

SUH, Y. A., ARNOLD, R. S., LASSEGUE, B., SHI, J., XU, X., SORESCU, D., CHUNG, A. B., GRIENDLING, K. K. et LAMBETH, J. D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1, *Nature* **401**, 79-82.

T

TEMPERTON, N. J., WILKINSON, S. R. et KELLY, J. M. (1996). Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*, *Molecular and Biochemical Parasitology* **76**, 339-343.

TODOROVIC, S., RODRIGUES, J. V., PINTO, A. F., THOMSEN, C., HILDEBRANDT, P., TEIXEIRA, M. et MURGIDA, D. H. (2009). Resonance Raman study of the superoxide reductase from *Archaeoglobus fulgidus*, E12 mutants and a 'natural variant', *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 1809-1815.

TSANEVA, I. R. et WEISS, B. (1990). SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology* **172**, 4197-4205.

U

UCHIDA, K., KATO, Y. et KAWAKISHI, S. (1990). A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical, *Biochemical and biophysical research communications* **169**, 265-271.

V

VALENTINE, J. S., WERTZ, D. L., LYONS, T. J., LIOU, L. L., GOTO, J. J. et GRALLA, E. B. (1998). The dark side of dioxygen biochemistry, *Current opinion in chemical biology* **2**, 253-262.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. et MAZUR, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1-40.

VERTUANI, S., ANGUSTI, A. et MANFREDINI, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Current Pharmaceutical Design* **10**, 1677-1694.

VON SONNTAG, C. (2008). Advanced oxidation processes: mechanistic aspects, *Water Science and Technology* **58**, 1015-1021.

W

WINK, D. A., NIMS, R. W., SAAVEDRA, J. E., UTERMAHLEN, W. E., JR. et FORD, P. C. (1994). The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6604-6608.

WINTERBOURN, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nature Chemical Biology* **4**, 278-286.

WU, J. et WEISS, B. (1992). 2-Stage induction of the soxrs (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* **174**, 3915-3920.

Y

YEH, A. P., HU, Y. L., JENNEY, F. E., ADAMS, M. W. W. et REES, D. C. (2000). Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states, *Biochemistry* **39**, 2499-2508.

YOST, F. J. et FRIDOVIC, I. (1973). Iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **248**, 4905-4908.

YOUN, H. D., KIM, E. J., ROE, J. H., HAH, Y. C. et KANG, S. O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces*, *Biochemical Journal* **318**, 889-896.

Z

ZHENG, M., ASLUND, F. et STORZ, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation, *Science* **279**, 1718-1721.

Annexes

Annexe 1

Mutant C13S de la SOR de *D. baarsii*

I. Construction, surexpression et purification du mutant

La mutation C13S a été produite par mutagenèse dirigée à partir du plasmide pMJ25, dans lequel le gène *sor* de *D. baarsii* a été cloné (Pianzzola et coll, 1996). Le protocole est décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Le plasmide résultant pDBC13S contenant la mutation C13S, est transformé dans la souche BL21 DE3 de *E. coli*.

Le mutant SOR C13S a été surproduit et purifié avec le même protocole que celui de la forme sauvage. Les cellules sont cultivées en aérobiose à 37 °C, en milieu M9 contenant de l'ampicilline et supplémenté en sels minéraux et en molécules organiques. La surexpression des protéines est induite par 1 mM d'IPTG lorsque l'absorbance à 600 nm est d'environ 0.5. Après 4 à 5 h de culture, les bactéries sont collectées. Le niveau d'expression de la protéine mutante est similaire à celui de la SOR sauvage.

Après purification par une chromatographie d'échange d'anions suivie d'une chromatographie par filtration sur gel, le rapport DO_{280}/DO_{644} de la solution protéique C13S oxydée par du chlorure d'iridium est de 11. Ce rapport permet d'estimer la pureté de la protéine à environ 85 %. Cependant sur gel SDS-page une seule bande à 14 kDa est visible, laissant supposer que la protéine est pure. Ces données suggèrent qu'une petite partie de la protéine est démétaillée. Il est à noter que la forme ferreuse du mutant SOR C13S est moins stable à l'air que celle de la SOR sauvage. En fin de purification, entre 0 et 20 % du site actif de la protéine est oxydé selon les préparations, alors que dans le cas de la SOR sauvage, la protéine reste 100 % réduite.

II. Caractérisation

L'analyse de la SOR C13S par spectrométrie de masse en mode électrospray et en conditions dénaturantes, révèle la présence d'un pic majoritaire d'un poids moléculaire de 14010.07 ± 2 Da. Cela correspondant à la masse attendue de la protéine C13S sans la méthionine N-terminale.

Le mutant C13S a été analysé par tamisage moléculaire (Superdex 75). Il est élué avec un poids moléculaire apparent de 28 kDa. Cela suggère que la structure quaternaire homodimérique de la SOR sauvage de *D. baarsii* a été conservée dans le mutant C13S.

Caractérisation du mutant C13S par spectroscopie UV-visible :

Comme le montre la Figure 112, le spectre UV-visible du mutant C13S oxydé par du chlorure d'iridium présente deux bandes d'absorption à 330 et 644 nm. L'allure de ce spectre est identique à celui de la SOR sauvage de *T. pallidum*, SOR possédant uniquement le site actif comme centre à fer (Lombard et coll, 2000). Aucune bande caractéristique du Centre I (pic à 370 nm et épaulement à 503 nm) n'est observée. Cela montre que la mutation C13S a bien permis d'éliminer le fer du Centre I de la SOR de *D. baarsii*.

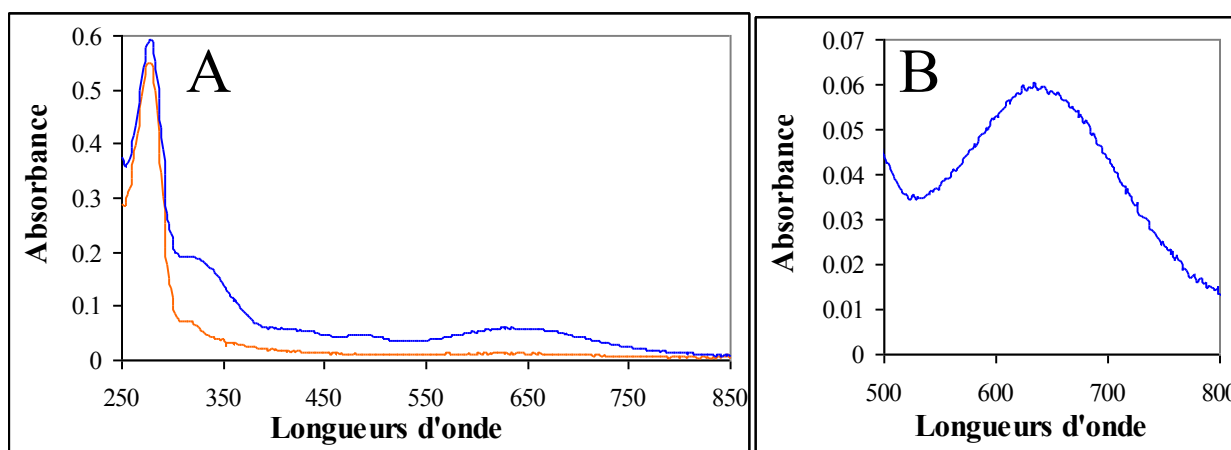


Figure 112 : (A) Spectre UV/visible de la SOR C13S (30 μ M) réduite (orange) et oxydée (bleu) dans 10 mM Tris/HCl pH 7.6. (B) Spectre agrandi de la forme oxydée de la SOR C13S.

Le coefficient d'extinction molaire du Centre II du mutant C13S n'a pas été déterminé avec précision. Cependant, d'après les données de la Figure 112, il semble très proche du centre de II de la SOR sauvage. De plus les données de radiolyse pulsée présentées plus loin montrent que après réaction avec $O_2^{\cdot-}$ le mutant C13S présente une absorbance à 650 nm identique à celle de la SOR sauvage.

Comme pour la SOR sauvage, le maximum d'absorbance du Centre II oxydé du mutant C13S se déplace de 644 nm à pH acide, vers 560 nm à pH basique (Figure 113). Le pKa apparent de cette transition alcaline pour la SOR C13S oxydée est de 8.30 ± 0.05 , une valeur légèrement plus faible que celui de la SOR sauvage (pKa = 9) (Nivière et coll, 2004).

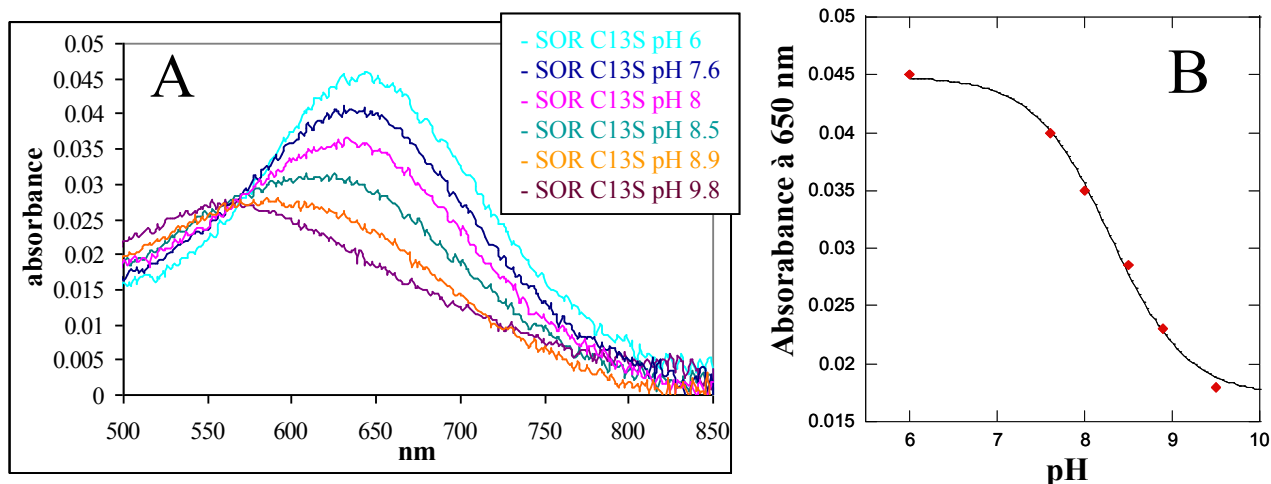


Figure 113 : (A) Spectre UV/visible de 25 μM de SOR C13S oxydée à pH 6, 7.6, 8, 8.5, 8.9 et 9.8 dans 10 mM de tampon. Au delà de pH 9.8, la SOR C13S n'est pas stable. (B) Variation de l'absorbance à 650 nm de la SOR C13S oxydée en fonction du pH. Le pKa est déterminé en modélisant les points avec l'équation $DO_{650\text{ nm}} = (m_1 + m_2 \times 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}) / (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})})$ où $\text{pKa} = 8.30 \pm 0.05$.

III. Réactivité du mutant avec $\text{O}_2^{\cdot-}$

La réaction du mutant C13S avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ a été étudiée par radiolyse pulsée dans les mêmes conditions expérimentales que la forme sauvage (cf. Chapitre IV Partie II.A). La concentration de la SOR est de 100 μM et les expériences sont réalisées dans une solution de 10 mM formiate, 2 mM tampon Tris/HCl à pH 7.6 et saturé par 100% de O_2 .

Les cinétiques de réaction du mutant C13S avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ (20 μM) montrent qu'à l'échelle de la μs , les absorbances entre 500 et 700 nm atteignent un plateau 50 μs après l'impulsion et sont stables pendant au moins 300 μs . Cela correspond à la formation d'un premier intermédiaire réactionnel, similaire à celui observé avec la forme sauvage de la SOR. La constante de vitesse de formation de ce premier intermédiaire pour le mutant C13S est de $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, valeur identique à celle obtenue avec la SOR sauvage. Le spectre d'absorption du 1^{er} intermédiaire obtenu est similaire à celui de la SOR sauvage, avec cependant une absorbance maximale à 600 nm très légèrement inférieure à celle obtenue pour la SOR sauvage à pH 7.6.

A une échelle de temps plus longue, des cinétiques de formation et d'évolution d'un second intermédiaire réactionnel sont observées et apparaissent très similaires à celles obtenues pour la SOR sauvage (cf. Chapitre IV Partie II.C). Le spectre d'absorption de l'espèce finale SOR Fe^{3+} est similaire à celui de la SOR sauvage, avec cependant une absorbance à 644 nm très légèrement inférieure à celle obtenue pour la SOR sauvage à pH 7.6. Pour le mutant C13S, toutes les cinétiques d'évolution du 1^{er} intermédiaire aux longueurs d'onde entre 500 et 700 nm peuvent être décrites comme la somme de deux exponentielles,

correspondant à deux processus indépendants de la concentration en protéine. Ces deux processus correspondent, comme pour la SOR sauvage à la formation du 2nd intermédiaire et à son évolution vers l'espèce finale. La constante de vitesse d'apparition du second intermédiaire est de $290 \pm 60 \text{ s}^{-1}$ et celle de la formation de l'espèce finale est de $100 \pm 38 \text{ s}^{-1}$, valeurs similaires à celle de la SOR sauvage ($260 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ et $110 \pm 24 \text{ s}^{-1}$) (cf. Chapitre IV Partie II.C).

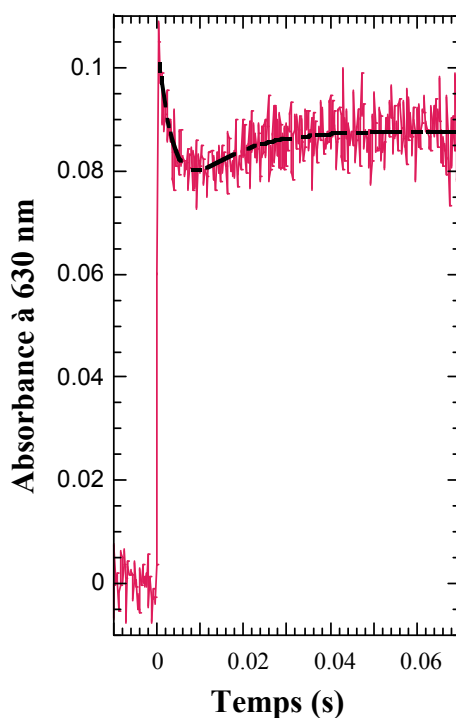


Figure 114 : Variation d'absorbance à 630 nm de la réaction de la SOR C13S (100 μM) avec 20 μM de $\text{O}_2^{\bullet -}$ générés par radiolyse pulsée dans 10 mM formiate et 2 mM Tris/HCl à pH 7.6. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

En conclusion, l'absorbance du Centre I dans le mutant C13S ne semble avoir aucune influence sur la réactivité de la SOR avec le superoxyde. Cela suggère que les propriétés du Centre II de la SOR ne sont pas affectées par la présence ou non du Centre I. Ce mutant C13S constitue donc un excellent outil pour étudier le rôle du Centre I dans les processus de transfert d'électrons des réductases vers le Centre II.

Annexe 2

Capacité des extraits de *E. coli* \pm Fpr pour réduire la SOR

Afin de déterminer l'importance relative de la Fpr par rapport à l'ensemble des réductases présentes chez *E. coli*, la capacité des extraits protéiques de *E. coli* possédant ou non la Fpr à réduire la SOR a été étudiée. Les extraits solubles des souches *sodA⁻sodB⁻fpr⁺sor⁺* et *sodA⁻sodB⁻fpr⁻sor⁺* de *E. coli* ont été préparés. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (Figure 115). Les extraits sont obtenus à partir de souche de *E. coli* qui sont *sodA⁻sodB⁻*. Ces souches sont très sensibles au stress oxydant du fait de leur incapacité à détoxifier le radical superoxyde. Le stress oxydant active le régulon *soxRS* qui induit notamment la Fpr. De plus ces souches sont transformées par le plasmide pMJ25, afin d'exprimer la SOR.

	Activité NADH	Activité NADPH
<i>fpr⁺</i> parentale + SOR induit par IPTG	124 U/mg	55 U/mg
<i>fpr⁺sodS⁻</i> + SOR induit par IPTG	179 U/mg	177 U/mg
<i>fpr⁻sodS⁻</i> + SOR induit par IPTG	240 U/mg	278 U/mg

Figure 115 : Activités NADPH et NADH SOR réductase des extraits solubles des souches QC1301 (parentale *fpr⁺*), QC2965 (*sodA⁻sodB⁻fpr⁺*) et QC 2973 (*sodA⁻sodB⁻fpr⁻*). La réduction de la SOR Fe^{3+} est initiée par l'ajout de 100 μg d'extraits solubles, à 25 °C, dans 100 μL contenant 500 μM de NADH ou NADPH, 200 μM de SOR de *D. baarsii* oxydée au chlorure d'iridium (IV) et 20 mM Tris/HCl pH 7.6. La réduction du Centre II de la SOR est suivie par UV/visible à 644 nm. 1 U correspond à 1 nmole de Fe^{3+} de la SOR réduite par minute.

Les extraits solubles totaux de *E. coli* de la souche *fpr⁻* présentent une activité SOR réductase similaire voir légèrement plus efficace par rapport à ceux de la souche *fpr⁺* (Figure 115). Ceci montre qu'il existe plusieurs réductases dans les extraits solubles de *E. coli* capables de réduire efficacement la SOR. Il apparaît que bien que la Fpr réduise efficacement la SOR *in vitro*, elle ne joue pas un rôle important dans l'activité SOR réductase des extraits solubles de *E. coli*. N'y a-t-il pas des réductases plus efficaces présentes dans les extraits ? Est-ce que l'absence de Fpr entraîne l'induction d'autres réductases au moins aussi efficaces pour réduire la SOR ?

Afin d'identifier les autres réductases de la SOR, les extraits solubles de souches de *E. coli* *sodA⁻sodB⁻fpr⁺* et *sodA⁻sodB⁻fpr⁻*, contenant le plasmide codant pour la SOR, ont été fractionnés sur une colonne de tamisage moléculaire S200 et leur capacité à réduire le Centre II de la SOR en présence de NADPH ou NADH a été testée. L'activité spécifique et l'activité totale de chaque fraction ont été déterminées afin d'apprécier l'importance relative des différentes réductases et de vérifier leur non-dénaturation après le passage sur colonne. Les résultats trouvés sur les extraits solubles des deux différentes souches étant très similaires, seuls ceux de la souche *sodA⁻sodB⁻fpr⁻* sont présentés (Figure 116).

Activité NAD(P)H/SOR réductase en U/mg de protéine				
	Activité NADPH	Activité NADPH + FMN	Activité NADPH + Riboflavine	Activité NADH
Fraction I ^b	0	11	30	60
Fraction II	0	0	9	28
Fraction III	0	0	8	8
Fraction IV	0	0	9	0
Fraction V	0	0	34	0
Fraction VI	0	65	149	0
Activité Totale retrouvée (AT) ^a	0 U	8686 U	27314 U	10971 U
% ^a =	0%	35%	109%	51%

^a Activité totale des fractions et pourcentage par rapport à l'activité totale déposée sur la colonne.

^b La fraction I correspond aux protéines ayant une masse de plus de 250 kDa. La fraction II entre 230 kDa et 137 kDa. La fraction III entre 137 kDa et 76 kDa. La fraction IV entre 76 kDa et 44 kDa. La fraction V entre 44 kDa et 28 kDa. La fraction VI moins de 28 kDa.

Figure 116 : Vitesse de réduction de la SOR par des extraits protéiques de souches *sodA⁻sor⁺fpr⁻* (QC2973). Les réductions sont initiées par l'ajout de 70 µL d'extrait soluble récupéré après tamisage moléculaire, à 25 °C, dans 100 µL contenant 600 µM de NADH ou NADPH, 110 µM de SOR de *D. baarsii* oxydée, 10 µM de FMN ou de riboflavine (tampon Tris/HCl 20 mM à pH 7.6). L'activité est suivie à 644 nm en UV/visible, pour la réduction du Centre II de la SOR

Sur la colonne de tamisage moléculaire les extraits *sodA⁻fpr⁻* déposés présentent une activité NADPH SOR réductase totale de 25 000 Unités et une activité NADH SOR réductase de 25 000 Unités. L'Activité totale (AT) est déterminée après tamisage moléculaire.

1 U/mg correspond à 1 nmole de Fe³⁺ de la SOR réduite par minute et par mg d'extraits solubles.

Les souches *sodA⁻sor⁺fpr⁻* présentent une activité NADPH-SOR-réductase totale de 25 000 unités avant tamisage moléculaire. Après tamisage moléculaire aucune activité NADPH n'est retrouvée (Figure 116).

Nous remarquons que toute l'activité déposée sur la colonne de tamisage moléculaire n'est pas retrouvée dans les fractions récupérées après la colonne. L'ajout de FMN et de Riboflavine permet cependant de retrouver une bonne partie de l'activité SOR réductase. Les fractions récupérées ont été congelées puis décongelées pour réaliser les divers tests

d'activité, il est possible que ces congélations/décongélations aient endommagé une partie des protéines.

Les flavines FMN, FAD et Riboflavine, sont cofacteurs et substrat de certaines réductases. Ces molécules sont petites (380 à 790 Da), elles peuvent être dissociées de certaines réductases et éliminées de l'extrait sur la colonne de tamisage moléculaire. L'activité SOR NADPH réductase des extraits des souches *sods⁻sor⁺fpr⁻* est testée en présence de flavines, FMN et riboflavine. L'ajout de flavines met en évidence une activité NADPH SOR réductase pour les protéines de petits poids moléculaire ainsi que celles de haut poids moléculaire. *E. coli* possède principalement trois flavines réductases solubles, avec par ordre décroissant d'importance : la NAD(P)H flavine oxydoréductase (Fre) (Fontecave et coll, 1987), la sulfite réductase (SiR) (Covès et coll, 1993), et la ferrédoxine NADP oxydoréductase (Fpr) (thèse de M. Eschenbrenner, 1995).

La Fre possède à la fois une activité NADPH et NADH réductase. Elle réduit les flavines libres présentes dans le cytoplasme comme la FMN et la Riboflavine. Cette protéine est sans aucun doute à l'origine de la majorité de l'activité SOR réductase observée dans les extraits protéiques. Elle explique les activités NADPH des fractions de petits poids moléculaire en présence de flavines libres ajoutées. Dans les fractions de gros poids moléculaire, toutes les protéines agrégées sont récupérées. L'activité NADPH-SOR-réductase observée uniquement en présence de FMN ou riboflavine dans les hauts poids moléculaire peut être due à Fre. En effet, il est possible que Fre soit piégée ou complexée dans les agrégats de protéine.

La sulfite réductase est une hémoflavoprotéine à haut poids moléculaire (780 kDa). Les sous-unités alpha de SiR sont identifiées comme responsables de l'activité NADPH flavine réductase de cette enzyme (Covès et coll, 1993). Cette protéine peut être responsable de l'activité NADPH des fractions à haut poids moléculaire en présence de flavine.

Les résultats trouvés sur les extraits solubles des souches *sodA⁻sodB⁻fpr⁺* et *sodA⁻sodB⁻fpr⁻* étant très similaires, seuls ceux de la seconde souche sont présentés (Figure 116). L'absence de différence entre les activités SOR réductases des extraits des souches *sods⁻fpr⁺* et ceux des souches *sods⁻fpr⁻* peut s'expliquer par diverses façons. Tout d'abord, il est possible que, bien que la Fpr réduise efficacement la SOR *in vitro*, son activité peut être négligeable par rapport à l'activité SOR réductase des extraits solubles totaux. Ensuite, il est possible que la production de Fpr dans les souches *fpr⁺* ne soit pas induite. En effet l'activité SOR réductase des autres réductases de *E. coli* peut être suffisamment efficace pour régénérer la

SOR. Il n'y a donc ainsi pas ou peu de stress oxydant dans la cellule et donc pas d'induction de soxRS, le régulon de Fpr. Dans tous les cas, cela suggère donc la présence de réductases efficaces autres que la Fpr.

Ces expériences sur les extraits de *E. coli* semblent indiquer que les flavines libres jouent un rôle essentiel dans la réduction de la SOR chez *E. coli*. L'examen des extraits protéiques met en évidence le rôle de la Fre qui semble être la réductase principale de la SOR de *D. baarsii* chez *E. coli*.

Annexe 3

Inhibiteurs de la SOR (ferrocyanure et analogues)

Pour certaines bactéries, la SOR peut être une très bonne cible d'agents antibactériens. En effet, certains pathogène pour l'homme, *T. pallidum* par exemple, l'agent infectieux responsable de la syphilis (Singh et Romanowski, 1999) ne possède pas de SOD (Fraser et coll, 1998). La SOR est son unique moyen de défense contre le stress superoxyde (Lombard et coll, 2000). La SOR n'est pas présente chez les eucaryotes et la découverte d'inhibiteurs de son activité pourrait permettre de lutter très spécifiquement contre ce pathogène. D'autres pathogènes pour l'homme possèdent aussi la SOR comme système antioxydant, tels certains *clostridium*s.

Actuellement aucun inhibiteur de la SOR n'a été caractérisé. Cependant, il a été montré que le ferricyanure $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ se complexe très spécifiquement au site actif de la SOR (Auchère et coll, 2003 ; Adam et coll, 2004). Le ferricyanure se fixe sur le 6^{ème} site de coordination du fer Fe^{2+} du site actif de la SOR et simultanément il y a échange d'un électron entre les deux fers. Il se forme alors un complexe très stable $\text{SOR-Fe}^{3+}-(\text{CN})_6\text{Fe}^{2+}$. Bien que le ferrocyanure ne soit pas inhibiteur de la SOR (Molina et coll, 2005), cette structure souligne la capacité tout à fait particulière du site actif de fixer spécifiquement un complexe organométallique. Cet aspect constitue le point de départ pour la recherche de véritables inhibiteurs de la SOR.

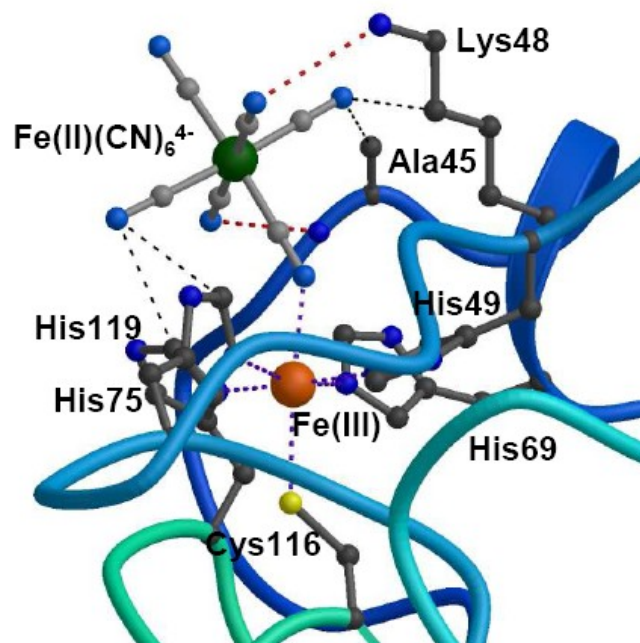


Figure 117 : Structure de la SOR de *D. baarsii* complexée avec le ferrocyanure (en rouge les liaisons hydrogène, en noirs les interactions de Van der Waals).

1. Les inhibiteurs potentiels et reconnaissance avec le site actif

La structure de la SOR de *D. baarsii* complexée avec le ferrocyanure montre que celui-ci est complètement imbriqué dans le site actif de la SOR (Adam et coll, 2004) (Figure 117). Cette complexation bloque l'accès au site actif de l'enzyme. Le ferrocyanure constitue donc un très bon modèle d'inhibiteur de la SOR.

Les inhibiteurs possibles de la SOR que nous avons testé sont les analogues du ferrocyanure. Certains des analogues étudiés sont commerciaux, tels les $\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})$, $\text{Mn}(\text{CN})_6$, $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3$, $\text{Co}(\text{CN})_6$, $\text{Ru}(\text{CN})_6$, $\text{Pt}(\text{CN})_6$, $\text{Cr}(\text{CN})_6$. Les analogues du ferrocyanure de type $\text{Fe}(\text{CN})_x(\text{CO})_y$ n'étant pas commerciaux, les composés $\text{Fe}(\text{CN})_3(\text{CO})_3$, $\text{Fe}(\text{CN})_4(\text{CO})_2$, $\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{CO})$ ont été synthétisés.

La structure de la SOR de *D. baarsii* complexée avec le ferrocyanure montre différentes interactions, liaisons hydrogène ou interactions de Van der Waals, des acides aminés de la seconde sphère de coordination du site actif avec le ferrocyanure (Adam et coll, 2004). Nous observons notamment une liaison hydrogène entre la Lys 48 et un CN^- du ferrocyanure ainsi qu'une interaction de Van der Waals entre l'alanine 45 et le ferrocyanure. L'étude des mutants K48I et A45K, pourrait nous permettre de voir l'importance de ces interactions pour la fixation du ferrocyanure et de ces analogues.

2. Etude de l'interaction SOR-ferricyanure

Afin de pouvoir comparer les interactions des analogues du ferricyanure avec la SOR à celle observées avec le ferricyanure, l'interaction SOR-ferricyanure est étudiée par différentes spectroscopies.

Etude de l'interaction SOR ferricyanure par Infra Rouge :

La complexation du ferrocyanure avec la protéine SOR a été étudiée par spectroscopie infrarouge. En effet sa complexation entraîne une modification du signal IR correspondant au CN. 4 mM de SOR Fe^{2+} sont mélangés avec 4 mM de ferrocyanure. L'analyse infra rouge du mélange montre une bande à 2038 cm^{-1} caractéristique du ferrocyanure libre. Le mélange est oxydé par ajout progressif d'une solution d'ammonium persulfate (APS). L'oxydation du mélange entre 0.5 et 1.5 équivalent par rapport à la SOR montre l'apparition de 3 bandes à 2024 , 2047 et 2095 cm^{-1} qui semblent caractéristiques du complexe SOR Fe^{3+} -ferrocyanure et la disparition progressive de la bande associée au ferrocyanure libre. L'oxydation permet clairement la formation d'un complexe SOR Fe^{3+} -ferro. Au delà de 2 équivalents d'oxydant l'analyse IR ne relève plus qu'une bande à 2116 cm^{-1} caractéristique du ferricyanure libre. Le ferricyanure s'est décomplexé de la SOR Fe^{3+} (Figure 118).

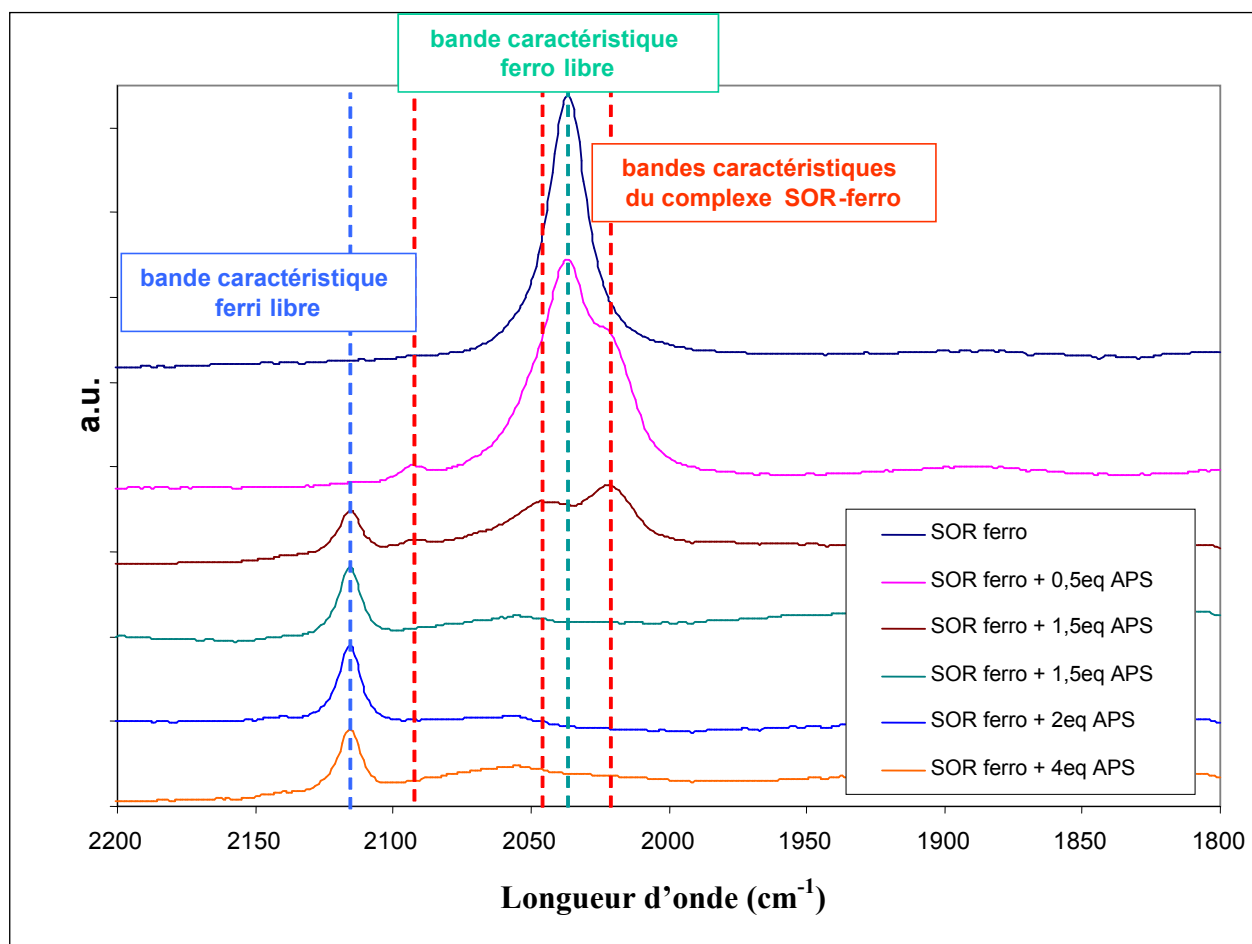


Figure 118 : Spectres IR de SOR (4 mM) en présence de ferrocyanure (4 mM) et de différentes quantités d'APS (ammonium persulfate) allant de 0 à 4 équivalents par rapport à la SOR dans 10 mM Tris/HCl pH 7,6. La bande caractéristique du ferrocyanure libre est attendue à 2038 cm^{-1} celle du ferricyanure libre est attendue à 2116 cm^{-1} .

Cette expérience suggère que le ferrocyanure ne peut se fixer à la SOR que lorsque le complexe formé est dans un état de valence mixte ($(\text{CN})_6\text{Fe}^{2+}\text{-SOR Fe}^{3+}$ ou $(\text{CN})_6\text{Fe}^{3+}\text{-SOR Fe}^{2+}$).

Etude de l'interaction SOR ferricyanure par UV-visible :

Au sein du complexe SOR Fe^{3+} -ferrocyanure, il se forme alors une liaison $\text{Fe}^{2+}\text{-CN-Fe}^{3+}$, très caractéristique en spectroscopie UV-visible avec une bande d'intervallence vers 900 nm.

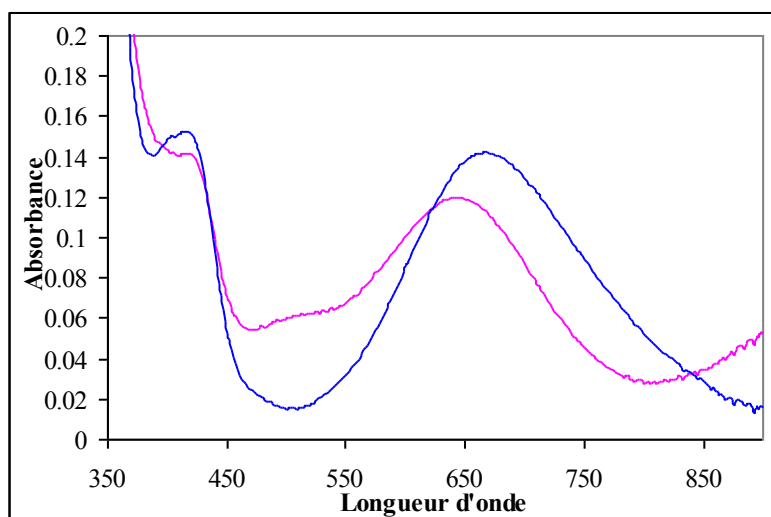


Figure 119 : Spectres UV-visible de 100 μM de SOR Fe^{2+} avec 200 μM de ferricyanure (trace **rose**) oxydé par APS (trace **bleu**) dont l'absorbance du Centre I a été retirée, dans 10 mM Tris/HCl à pH 7.6.

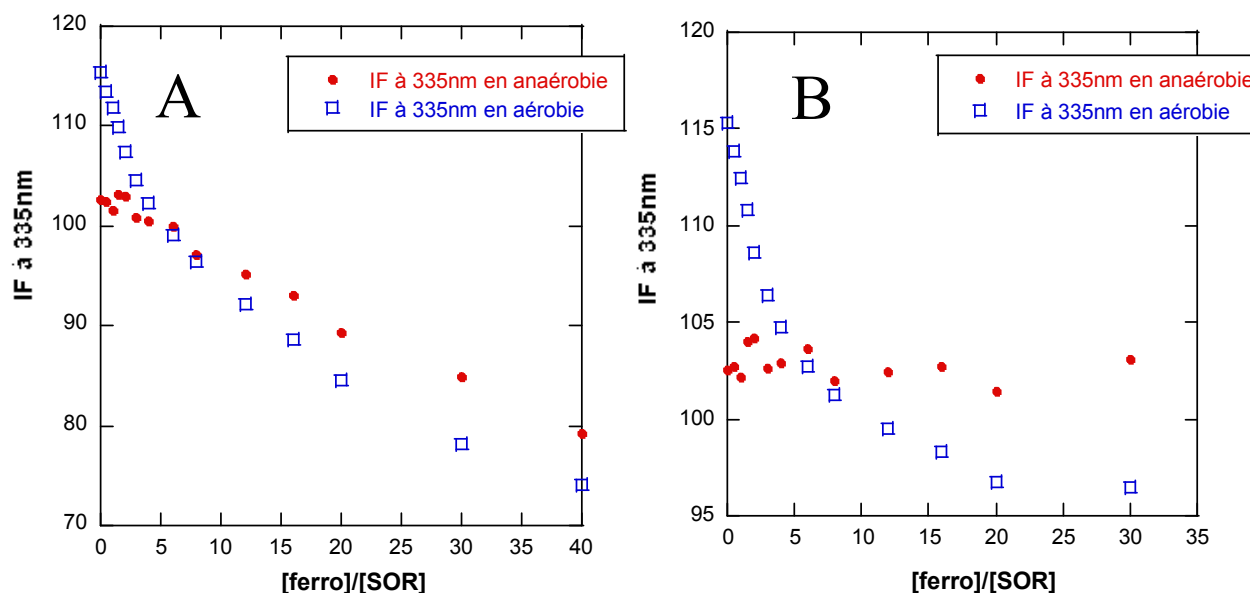
Cette bande d'intervalle n'est pas présente si la cuve contient de la SOR Fe^{2+} avec du ferrocyanure. Elle n'est pas présente non plus si la SOR Fe^{3+} est mélangée avec du ferrocyanure. Seul le complexe formé avec les fers correspond à un état de valence mixte ($(\text{CN})_6\text{Fe}^{2+}\text{-SOR Fe}^{3+}$ ou $(\text{CN})_6\text{Fe}^{3+}\text{-SOR Fe}^{2+}$) présente cette bande d'intervalle.

Etude de l'interaction SOR ferrocyanure par Fluorimétrie :

La complexation du ferrocyanure avec la protéine SOR a été étudiée par fluorescence. En effet, un tryptophane se trouve proche du site actif. Par son noyau indol, le tryptophane présente une émission de fluorescence dont les caractéristiques, longueur d'onde et intensité, peuvent être largement modulées par l'environnement de ce noyau. Dès lors, tout événement qui modifie le voisinage d'un tryptophane a pour effet de modifier sa fluorescence. Ainsi la complexation d'un composé au site actif peut créer une modification de sa fluorescence.

La variation de la fluorescence émise à 335 nm par 2 μM de SOR excitée à 295 nm sous azote et en présence de différentes concentrations de ferrocyanure allant de 0 à 80 μM est étudiée dans 3 mL de tampon Tris/HCl 10 mM à pH 7.6. Nous observons une décroissance linéaire de la fluorescence émise à 335 nm (Figure 120, points rouges). Cependant cela est dû uniquement au ferrocyanure libre en solution qui induit un effet filtre. Si nous soustrayons cet effet filtre du ferrocyanure, nous observons que la fluorescence de la SOR reste inchangée au cours des ajouts de ferrocyanure (Figure 120, points rouges). Notons que la même expérience a été réalisée en aérobie et semble montrer la fixation de plusieurs équivalents de ferrocyanure sur une molécule de SOR (Figure 120, points bleus). Cependant, un spectre UV-visible réalisé

sur la SOR en fin d'expérience montre que toute la SOR est sous forme Fe^{3+} . En présence de dioxygène et de la SOR, une partie du ferrocyanure est oxydée en ferricyanure. Ce dernier se fixe au site actif de la SOR en l'oxydant. L'oxydation du site actif de la SOR induit un quenching de fluorescence se superposant à celui induit par la fixation du ferricyanure. Aucune conclusion ne peut être tirée des expériences de fluorescence réalisées à l'air.



Cette expérience a permis de confirmer que le ferrocyanure ne peut pas se fixer à la SOR Fe^{2+} .

Pour conclure, il semble donc clair que le complexe $\text{Fe}(\text{CN})_6$ ne se complexe au site actif de la SOR uniquement si les deux fers sont dans des états de valence différents.

3. Etude de l'interaction SOR-analogues du ferricyanure

L'étude de l'interaction entre la SOR et les analogues du ferricyanure a été réalisée en IR. Afin de déterminer si les différents analogues sont capables de se fixer à la SOR, un spectre IR du composé seul a été réalisé puis un spectre du composé avec un équivalent de SOR Fe^{2+} . Le spectre IR des analogues $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_5(\text{CO})$ et $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_5(\text{NO})$ ne changent pas en présence ou non de SOR, cela suggère qu'ils ne se fixent pas à la protéine réduite. L'analogue

$\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_5\text{NH}_3$ semble se fixer à la protéine réduite. La bande à 2117 cm^{-1} correspondant à $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_5\text{NH}_3$ seule disparaît lorsque la SOR est présente et les bandes à 2048 et 2023 cm^{-1} apparaissent. L'étude de l'interaction en IR de la SOR avec les analogues du ferrocyanure, semble montrer qu'ils ne se fixent à la SOR que lorsque le complexe formé est de valence mixte (composé $\text{Fe}^{2+}\text{-SOR Fe}^{3+}$ ou composé $\text{Fe}^{3+}\text{-SOR Fe}^{2+}$).

En UV-visible, une bande d'intervallence à 900 nm , identique à celle observée lors du mélange de la SOR Fe^{2+} avec le ferricyanure, n'est présente que lorsque le complexe formé avec le fer correspond à un état de valence mixte (analogue- $\text{Fe}^{2+}\text{-SOR Fe}^{3+}$ ou analogue- $\text{Fe}^{3+}\text{-SOR Fe}^{2+}$) avec les composés $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3$ et $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{CO}$. Aucune modification du spectre de la SOR réduite et oxydée n'est observée lorsque les composés $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$, $\text{Fe}(\text{CN})_3(\text{CO})_3$, $\text{Pt}(\text{CN})_6$, $\text{Cr}(\text{CN})_6$, $\text{Co}(\text{CN})_6$ sont présents dans le milieu réactionnel. Cela laisse suggérer qu'aucun complexe n'est formé avec ces composés. De manière intéressante la présence de $\text{Ru}(\text{CN})_6$ dans le milieu décale la bande du Centre II oxydé de la SOR de 644 nm à 740 nm . Ce composé interagit donc avec le site actif de la SOR.

En fluorimétrie les expériences avec les analogues de ferricyanure ont été réalisées à l'air et donc, comme pour le ferricyanure, une grande partie de la SOR s'est oxydée en présence du complexe. Cela a induit un biais sur l'ensemble de nos mesures qui nous empêche de conclure quand à la possible fixation des analogues sur le site actif de l'enzyme.

Des tests d'inhibition sur la SOR des différents analogues du ferrocyanure ont été réalisés en radiolyse pulsée. Les composés $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_3(\text{CO})_3$, $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_4(\text{CO})_2$, $\text{Pt}(\text{CN})_6$, $\text{Cr}(\text{CN})_6$, $\text{Co}(\text{CN})_6$ et $\text{Ru}(\text{CN})_6$ ne semblent avoir aucun effet sur la réaction de réduction du superoxyde par la SOR. Les analogues $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_5(\text{CO})$ et $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_5\text{NO}$ montrent un effet inhibiteur sur la SOR, en présence de 2 équivalents par rapport à la SOR la constante de vitesse de réaction de la SOR avec le superoxyde (k_I) est diminué par deux. $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_5(\text{NH}_3)$ et $\text{Mn}(\text{CN})_6$ ralentissent très fortement k_I mais cela est probablement dû au fait qu'il oxyde la SOR (ralentissement d'un facteur 10 avec 1 à 2 équivalents). Le plus fort ralentissement de k_I est observé en présence de ferrocyanure, k_I est ralentie d'un facteur en présence de 2 équivalents de ferrocyanure par rapport à la SOR. Les effets inhibiteurs observés sur les constantes de vitesse de la réaction de la SOR avec le superoxyde sont toutefois faibles.

Pour conclure, nous pouvons dire que dans la recherche d'inhibiteurs de la SOR, le ferrocyanure n'est peut être pas un très bon modèle. En effet il ne se fixe au site actif de la SOR que lorsque le complexe formé avec le fer du site actif de la SOR forme une valence mixte (ferrocyanure-SOR Fe^{3+} ou ferricyanure-SOR Fe^{2+}). Cela suggère donc que les interactions entre les CN du ferrocyanure et les résidus K48 et A45 de la SOR sont faibles.

Annexe 4

L'influence du formiate dans les expériences de radiolyse pulsée

La présence de formiate est nécessaire pour générer spécifiquement une quantité définie de superoxyde aux cours des expériences de radiolyse pulsée. Cependant, il a été montré chez la SOR de *D. vulgaris* que sa forme acide associée, l'acide formique, pouvait influencer sur les constantes de vitesse de protonation du T_1 formé au cours de la réaction de la SOR avec le superoxyde, chez la SOR de *D. vulgaris* (Huang et coll, 2007). Afin de déterminer cette influence du formiate/acide formique sur la SOR de *D. baarsii*, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations du formiate entre 10 et 100 mM sur les constantes de vitesse k_1 , k_2 et k_3 . Nous avons mis en évidence que k_1 et k_3 sont indépendantes de la concentration de formiate, de pH 5.5 à 9.5.

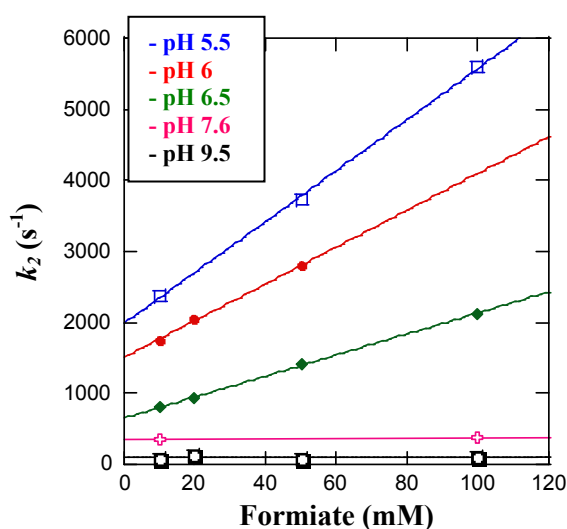


Figure 121 : Effet du formiate sur la constante de vitesse k_2 de la SOR sauvage de *D. baarsii* (100 μ M) avec 8 ou 12 μ M de $O_2^{\cdot -}$ dans 2 mM de tampon à différent pH : pH 5.5 (bleu), pH 6 (rouge), pH 6.5 (vert), pH 7.6 (rose) et pH 9.5 (noir).

Par contre k_2 dépend de la concentration en formiate (Figure 121). Lorsque k_2 est tracé en fonction de [formiate] à différents pH, nous obtenons une série de droites. Plus le pH est acide plus la pente de la droite obtenue est forte, c'est-à-dire plus la dépendance de k_2 au formiate est forte. Au delà de pH 7, l'influence de [formiate] sur k_2 est pratiquement négligeable.

Afin de déterminer si l'effet du formiate à pH acide n'est pas du à sa forme acide, l'acide formique, la dépendance de k_2 est exprimée cette fois ci en fonction de la concentration d'acide formique présente à un pH donné. Cette concentration est calculée, d'après la valeur du pKa du couple $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ de 3.74, en fonction de la concentration de formiate ajoutée à la solution. Les données sont présentées Figure 122.

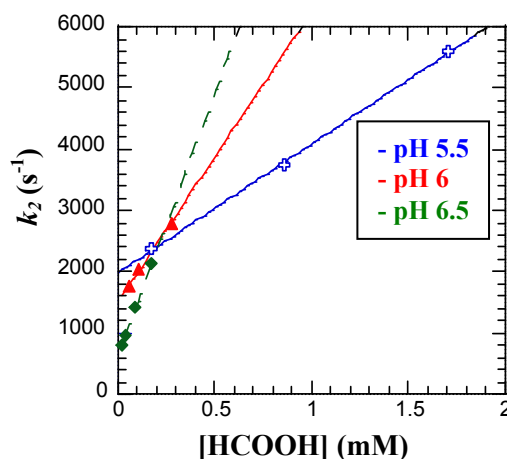


Figure 122 : Effet de la concentration de l'acide formique observé sur la constante de vitesse k_2 pour la réaction de la SOR de *D. baarsii* avec 9 ou 12 μM de $\text{O}_2^{\cdot -}$ dans 2 mM de tampon à différent pH. pH 5.5 (bleu), pH 6 (rouge), pH 6.5 (vert).

A un pH donné, la dépendance de k_2 à $[\text{HCOOH}]$ est linéaire et peut être écrite $k_2 = k' + k_{\text{HCOOH}}[\text{HCOOH}]$ avec k_{HCOOH} dépendant du pH. La constante de vitesse de protonation k_2 est donc proportionnelle à la concentration d'acide formique. Cela correspond à un processus de catalyse acide générale. HCOOH est donc capable de protoner le 1^{er} intermédiaire réactionnel de la SOR formé au cours de sa réaction avec le superoxyde par catalyse acide générale. Cela explique donc la dépendance de k_2 au formiate, observée aux pH acide et à forte concentration de formiate. Au delà d'un certain pH et à faible concentration de formiate, la quantité d'acide formique présent dans le milieu devient négligeable et ne joue plus le rôle de catalyse acide générale dans la formation de T_2 .

Notons que l'effet formiate observé n'est pas du à la force ionique. A pH 6.5, le même effet formiate est observé à force ionique constante par l'ajout de NaCl, et dans les mêmes conditions sans ajout de NaCl.

Afin de limiter le biais apporté par le formiate sur les constantes de vitesse, toutes les expériences de radiolyse pulsée ont été réalisées à des concentrations en formiate de 10 mM. Les droites obtenues lorsque k_2 est tracée en fonction de [formiate], permettent d'extrapoler la

valeur de k_2 en absence de l'effet formiate. Pour les $\text{pH} \leq 6.5$, les valeurs de k_2 présentées dans le chapitre IV pour la SOR sauvage de *D. baarsii* sont les valeurs de k_2 extrapolées en absence de formiate. Cela permet d'étudier l'effet du pH sur k_2 sans l'influence du formiate. Plus le pH est acide, plus l'effet du formiate est important. Au delà de pH 7 l'effet formiate est négligeable (Figure 121).

Annexe 5

Calcul du spectre d'absorption de T_2 à pH 7.6

Pour la SOR sauvage de *D. baarsii*, à pH 7.6, k_2 et k_3 sont très proches (254 s^{-1} et 110 s^{-1}). A ce pH et aux longueurs d'onde en dessous de 610 nm, ces deux cinétiques sont décroissantes. La modélisation de deux cinétiques décroissantes, avec des constantes de vitesse proches, présente une grande incertitude sur les valeurs des amplitudes de chacune des cinétiques. L'allure de la courbe attendue lorsque les deux cinétiques sont décroissantes est représentée (Figure 123 B). Cette modélisation reprend les paramètres de la cinétique à 640 nm (Figure 123 A) où k_2 et k_3 sont clairement déterminées car dans des sens différents, mais en supposant k_3 décroissante. La courbe obtenue est proche d'une mono-exponentielle de constante de vitesse 140 s^{-1} et la cassure de pente n'est pas visible.

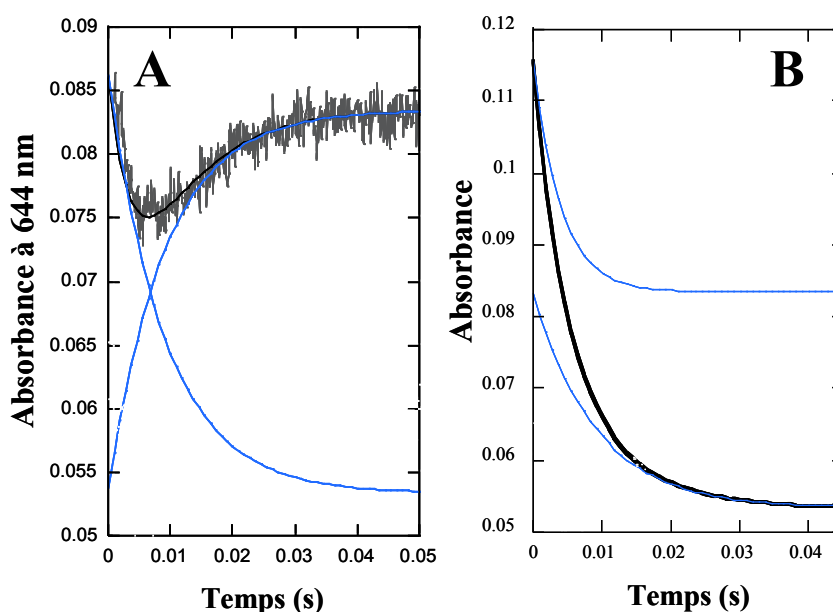


Figure 123 : (A) Variation de l'absorbance à 640 nm (**gris**) décrite Figure 68. La courbe noire est la modélisation de la cinétique par un processus bi-exponentiel $A = A_1 \exp(-255 \times t) - A_2 \exp(-110 \times t) + A_3$ avec, $A_1 = 0.0333$, $A_2 = 0.0301$ et $A_3 = 0.0835$. Les courbes **bleues** représentent chacune l'une des deux phases du modèle bi-exponentiel, correspondant soit à la formation du T_2 $A = A_1 \exp(-255 \times t) - A_2 + A_3$ soit à celle de T_3 $A = A_3 - A_2 \exp(-110 \times t)$. (B) la variation d'absorbance obtenue si ces deux cinétiques étaient décroissantes. En **noir** la modélisation de la variation d'absorbance bi-exponentielle ; en **bleu** la modélisation de chacune des deux exponentielles.

La Figure 124 montre la variation d'absorbance à 580 nm lors de la réaction de la SOR avec le superoxyde ; toutes les cinétiques entre 500 et 610 nm ont une allure de courbe similaire à cette cinétique. La variation d'absorbance à ces longueurs d'onde ressemble à une

mono exponentielle avec une constante de vitesse entre 100 et 150 s⁻¹, pouvant correspondre à la somme de deux cinétiques décroissantes décrites par k_2 et k_3 . Le bruit de fond des traces et la faible cassure de pente attendue rendent impossible une déconvolution correcte des deux amplitudes des cinétiques avec une si faible différence de constante de vitesse.

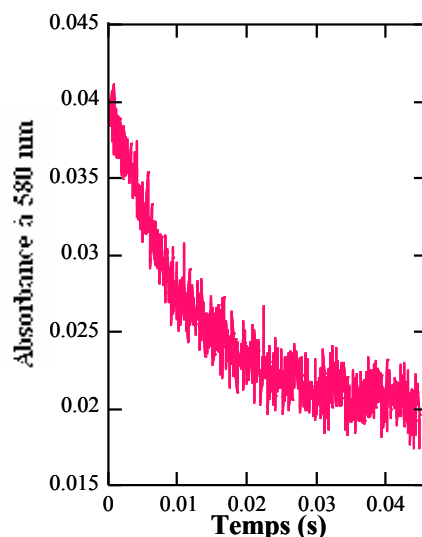


Figure 124 : Variation de l'absorbance à 580 nm durant la réaction de la SOR de *D. baarsii* (100 μM) avec O₂^{•-} (8 μM), généré par radiolyse pulsée, dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6. A cette longueur d'onde les deux cinétiques décrites par k_2 et k_3 sont décroissantes. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Dans ces conditions, il est alors difficile de calculer un spectre du second intermédiaire de manière juste. Il est probable que tous les points d'absorbance calculés en dessous de 610 nm soient largement surestimés, k_2 étant souvent supposée presque nulle par le logiciel de modélisation qui favorise la modélisation proche d'une mono-exponentielle (KaleidaGraph).

Annexe 6

Dépendance de la constante de vitesse k_3 du mutant SOR K48I au pH

Dans les expériences de radiolyse pulsée, à $\text{pH} < 8$, pour le mutant SOR K48I, les cinétiques obtenues à toutes les longueurs d'onde entre 500 et 700 nm sont modélisables par trois exponentielles, comme pour la SOR sauvage. Cela correspond à la formation de trois espèces différentes, T_1 , T_2 et l'espèce finale au cours de la réaction avec des constantes de vitesse k_1 , k_2 et k_3 .

A $\text{pH} > 8$, très peu de T_2 est formé (environ 10 % du T_1) et un retour proche de zéro des absorbances est observé entre 500 et 700 nm. Seule la proportion de SOR qui forme T_2 évolue en T_3 avec une constante de vitesse k_3 . Ainsi à $\text{pH} > 8$, la cinétique correspondant à k_3 à une amplitude trop faible pour être observée, elle ne peut pas être étudiée à ces pH.

Cette cinétique décrite par k_3 correspond pour le mutant K48I, comme pour la SOR sauvage, au déplacement du ligand hydroxyle du fer par le glutamate 47. Ainsi l'étude de la dépendance de k_3 de la SOR K48I au pH n'est possible qu'à $\text{pH} < 8$.

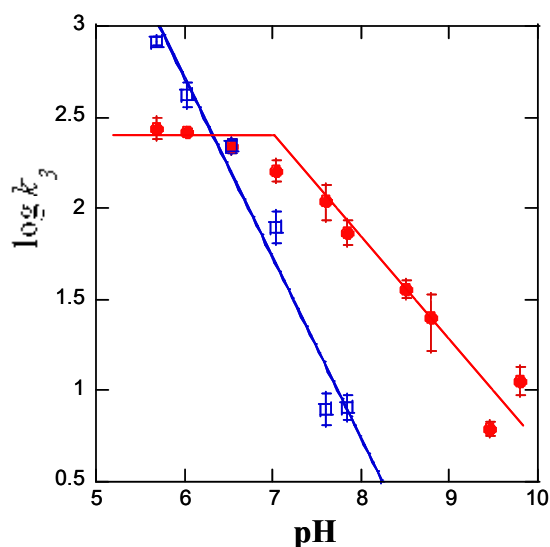


Figure 125 : Effet du pH sur la constante de vitesse k_3 pour la réaction de la SOR sauvage (rouge) et de son mutant K48I (bleu) de *D. baarsii* (100 μM) avec 8 μM ou 12 μM de $\text{O}_2^{\cdot -}$ dans 10 mM formiate et 2 mM tampon pour le mutant K48I. Pour le mutant K48I, la dépendance de $\log k_3$ au pH peut être modélisée par une droite d'équation : $\log(k_3) = \log(k_0) - 0.99 \times \text{pH}$ avec $k_0 = 4.26 \times 10^8$.

Pour le mutant K48I, à $\text{pH} < 8$, la dépendance de k_3 au pH est modélisable par l'équation $\log(k_3) = \log(k_0) - 0.99 \times \text{pH}$ où k_0 est la constante de vitesse lorsque le pH

approche zéro, calculée à une valeur de $4.26 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 125). La dépendance de $\log k_3$ au pH est linéaire avec une pente de 1 à $\text{pH} < 8$.

La constante de vitesse k_3 de la SOR K48I présente une dépendance au pH légèrement différente de celle observée dans la SOR sauvage (Figure 125). Par spectroscopie de résonance Raman, il a été montré que la Lysine 48 interagit par liaison hydrogène avec le ligand HO^- de l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$. La présence de cette liaison hydrogène affaiblit la liaison Fe-OH , ce qui se traduit par un pKa plus faible pour la transition alcaline de la SOR K48I Fe^{3+} finale par rapport à l'enzyme sauvage (Mathé et coll, 2005). La perte de la liaison hydrogène avec le ligand HO^- peut aussi diminuer le pKa de T_2 . Cela pourrait décaler la cassure de pente attendue, pour la représentation de $\log k_3$ en fonction du pH, vers un pH plus acide. En effet si la cassure de pente de $\log k_3$ est présente à un $\text{pH} \leq 6$, elle ne serait pas observée dans nos expériences (Figure 125). Par ailleurs, le spectre UV-visible calculé par l'intermédiaire réactionnel T_2 , correspondant à l'espèce $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ en équilibre acide base avec $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$, n'est pas accessible pour le mutant K48I. En effet à pH basique, une très faible proportion de SOR K48I évolue vers cette espèce, la grande partie de la protéine évoluant vers une espèce Fe^{2+} . Les variations d'absorbance correspondant à l'évolution du T_2 sont trop faibles pour être modélisées.

Ces résultats suggèrent donc que la lysine K48I peut jouer un rôle dans l'équilibre entre les espèces correspondant au T_2 , $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ et $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$ en affaiblissant le pKa cet équilibre.

Annexe 7

Rôle de la lysine chez la SOR de *T. pallidum*

La lysine 48 de la SOR de *D. baarsii* est un résidu qui est strictement conservé dans l'ensemble des séquences de SORs connues à ce jour. Comme nous l'avons vu dans la partie III du chapitre IV, dans la SOR de *D. baarsii*, elle semble avoir un rôle primordial. En est-il de même chez toutes les SORs ?

Des études préliminaires de radiolyse pulsée sont réalisées sur la SOR de *T. pallidum* sauvage ainsi que sur son mutant K49I. La lysine 49 de la SOR de *T. pallidum* correspond à la lysine 48 de la SOR de *D. baarsii*.

Après réaction de la SOR sauvage et le mutant K49I de *T. pallidum* avec $O_2^{\bullet-}$, à certaines longueurs d'onde, autour de 620 nm, les traces obtenues sont modélisables par la somme de trois exponentielles correspondant à la formation de trois espèces différentes : $DO = A - A_1 \times e^{(-k_1x)} + A_2 \times e^{(-k_2x)} - A_3 \times e^{(-k_3x)}$; (avec $A = A_1 - A_2 + A_3$). Cependant, l'amplitude de la cinétique k_3 est tellement faible sur la SOR de *T. pallidum* sauvage comme sur son mutant que nous ne pouvons pas la modéliser correctement sur l'ensemble des pH et des longueurs d'onde étudiées. Les valeurs sont rapportées Figure 126.

		k_1 en s^{-1}	\pm	k_2 en s^{-1}	\pm
Tp WT	pH 7.6	62000	600	448	55
	pH 9.1			140	11
Tp K49I	pH 7.6	5100	30	577	84
	pH 9.1			173	9

Figure 126 : Constantes de vitesse k_1 et k_2 de la SOR sauvage et du mutant K49I de *T. pallidum* avec $O_2^{\bullet-}$ mesurées par radiolyse pulsée dans 10 mM formiate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6 ou 2 mM Glycine/NaOH pH 7.6.

Comme pour la SOR de *D. baarsii*, l'absence de la lysine entraîne un ralentissement de la constante de vitesse k_1 d'un facteur 10 environ. Les constantes de vitesse k_2 de la SOR sauvage et du mutant K49I de *T. pallidum* semblent très similaires.

De même que pour la SOR de *D. baarsii*, les spectres d'absorption du 1^{er} intermédiaire et ceux de l'espèce finale sont reconstitués. Le spectre d'absorption du 1^{er} intermédiaire réactionnel T₁ de la SOR K49I de *T. pallidum* est relativement similaire de celui obtenu avec la SOR sauvage. En effet, comme le montre la Figure 127, le spectre du 1^{er} intermédiaire de la

SOR K49I possède toujours une bande d'absorption large, centrée à 600-610 nm, d'allure similaire à celui de la SOR sauvage. Cependant, l'intensité de son maximum d'absorption du T_1 du mutant K49I semble très légèrement plus faible que celle de la SOR sauvage (Figure 127). Le spectre UV-Visible du 1^{er} intermédiaire de la SOR sauvage de *T. pallidum* et celui de son mutant K49I sont identiques à pH 7.6 et 9.1.

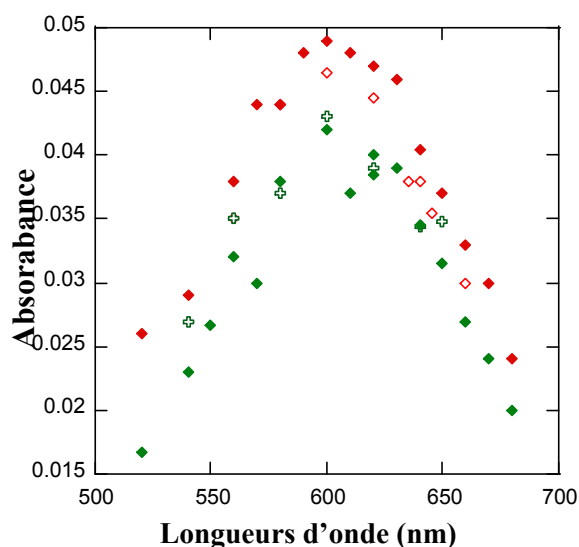


Figure 127 : Spectres reconstitués du 1^{er} intermédiaire de la SOR sauvage (**rouge**) et du mutant K49I (**vert**) de *T. pallidum* (100 μ M), 100 μ s après réaction avec 8 μ M de $O_2^{\cdot -}$ à pH 7.6 (points **pleins**) et pH 9.1 (points **vides**) dans 10 mM formiate, 2 mM tampon. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Le spectre d'absorption de la SOR sauvage de *T. pallidum* et de son mutant K49I (100 μ M) est reconstitué 1 ms après réaction avec 8 μ M de superoxyde. Le spectre reconstitué est comparé à celui de la SOR oxydée au pH correspondant. Pour la SOR sauvage de *T. pallidum*, le spectre reconstitué 1 ms après réaction avec le superoxyde se superpose parfaitement avec le spectre de la SOR Fe^{3+} au pH considéré (Figure 128, traces rouges). Pour le mutant K49I, le spectre reconstitué 1 ms après réaction avec le superoxyde se superpose avec le spectre de la SOR Fe^{3+} à pH 7.6 (Figure 128A, trace verte). Mais à pH 9.1, le spectre reconstitué 1 ms après réaction avec le superoxyde est différent du spectre de la SOR Fe^{3+} (Figure 128B, trace verte). Son maximum d'absorption est décalé. Le spectre du mutant K49I oxydé à pH 9.1 présente un maximum à 560 nm alors que le spectre reconstitué 1 ms après réaction avec $O_2^{\cdot -}$ présente un maximum à 630 nm.

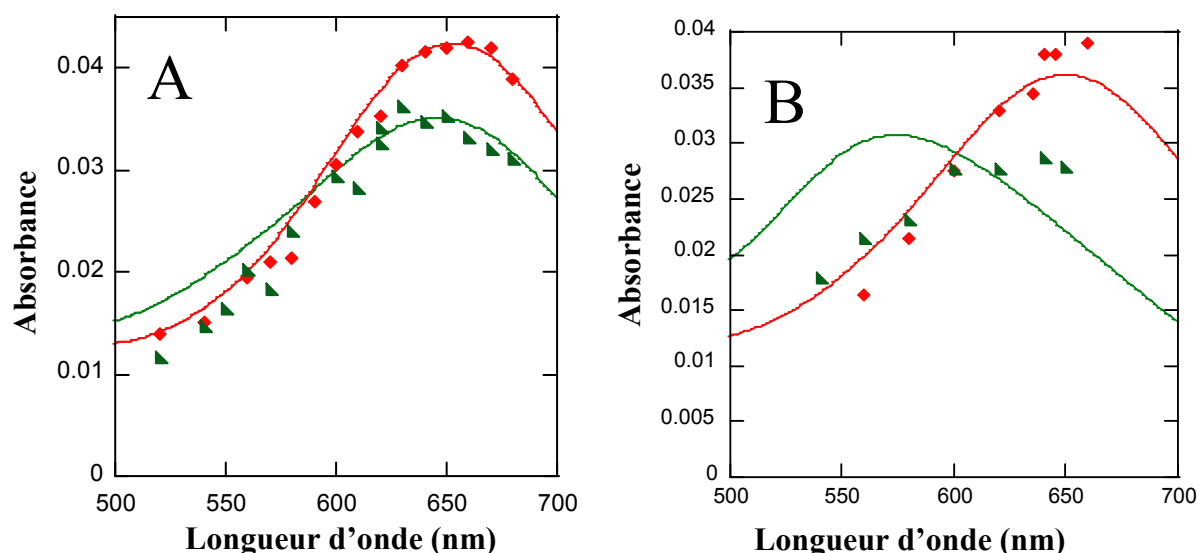


Figure 128 : Spectres reconstitués de la SOR finale (**A**) à pH 7.6 et (**B**) à pH 9.1, de la SOR sauvage (♦) et de son mutant K48I (▲) de *T. pallidum* (100 μ M) après réaction avec 8 μ M de $O_2^{\cdot-}$ dans 10 mM formiate, 2 mM tampon Tris/HCl ou Glycine/NaOH. Les spectres de 8 μ M de SOR oxydée au chlorure d'iridium sont représentés en trait continu. L'absorbance est mesurée dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

Un spectre UV visible est réalisé 1 min après l'impulsion, dans un spectrophotomètre classique. 100 μ M du mutant K49I sont mis à réagir avec 20 μ M de superoxyde généré par radiolyse pulsée (impulsion de 31 Gy). L'expérience est réalisée à pH 9.1 dans 2 mM glycine/NaOH. De la catalase est additionnée au milieu réactionnel de manière à éviter toute réaction avec l' H_2O_2 formé. A pH 9.1, le spectre présente une bande à 630 nm, identique à celle obtenue sur le spectre reconstitué à ce pH (Figure 128B, trace verte). Cette expérience confirme que le spectre reconstitué à pH 9.1, 1 ms après réaction avec le superoxyde, est bien l'espèce finale. Cette espèce présente un spectre différent de celui du mutant K49I Fe^{3+} . L'espèce présentant une bande à 630 nm à pH 9.1 n'a pas encore été identifiée.

Les résultats montrent qu'à pH 9.1 l'espèce finale obtenue sur le mutant K49I est différente de la SOR Fe^{3+} . Ces données suggèrent donc que la lysine 49 de *T. pallidum* joue un rôle au cours du mécanisme de réduction du superoxyde par la SOR. Cependant chez la SOR de *D. baarsii* cette lysine permet la protonation de l'oxygène proximal de l'intermédiaire fer-peroxyde permettant la libération de la molécule d' H_2O et la formation de l'espèce oxydée. En son absence, l'intermédiaire Fe^{3+} -OOH évolue vers une espèce Fe^{2+} . Chez la SOR de *T. pallidum*, l'absence de la lysine ne conduit pas à la formation d'espèce Fe^{2+} au cours de la catalyse mais à la formation d'une espèce oxydée non caractérisée. Ainsi il est difficile de conclure sur le rôle de cette lysine au cours de la catalyse de la SOR de *T. pallidum*.

Annexe 8

Réduction de la SOR K48I par H₂O₂

Dans un premier temps, la réaction de la SOR K48I avec H₂O₂ est étudiée en UV-visible. H₂O₂ semble peu réactif vis-à-vis du mutant K48I sous la forme Fe²⁺. La réaction de la SOR K48I Fe²⁺ avec 6 équivalents de H₂O₂ est suivie au spectrophotomètre, le spectre d'absorption ne varie pas au cours du temps à pH 7 (tampon bis Tris/HCl) ou à pH 9 (tampon Glycine) sur 25 min. Si la quantité de H₂O₂ est augmentée à 25 équivalents, une très légère dénaturation du Centre I de l'enzyme est alors observée, accompagnée d'une très légère oxydation (environ 5 %). Le reste de la protéine ne s'oxyde pas et ne se dégrade pas (contrôle par oxydation avec K₂IrCl₆).

Cependant, et de façon surprenante, le site actif oxydé de la protéine K48I est réduit par H₂O₂. Lorsque 90 µM de K48I oxydées à l'iridium (l'excès d'iridium est supprimé par lavage au centricon) sont mélangés à 70 µM H₂O₂ à pH 7, 7.6 et 8.5, nous observons une diminution de l'absorbance à 560 ou 644 nm selon le pH considéré, reflétant la réduction du Centre II (Figure 129).

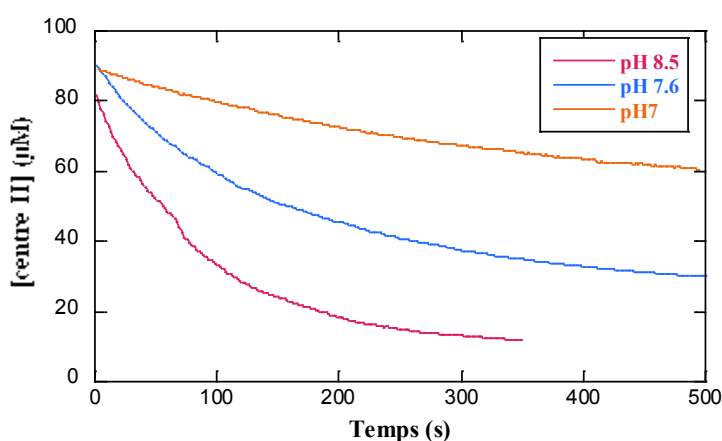


Figure 129 : Variation de l'absorbance à 644 nm à pH 7 (λ_{max} du Centre II oxydé), à 610 nm à pH 7.6 (λ_{max} du Centre II oxydé) et à 560 nm à pH 8.5 (λ_{max} du Centre II oxydé) lors de la réaction de 90 µM de SOR Fe³⁺ avec 70 µM de H₂O₂, dans 10 mM de tampon (tampon bis Tris/HCl ou Tris/HCl).

Nous remarquons que plus le pH est basique et plus cette réaction est rapide. A pH 5.5, la protéine ne se réduit plus en présence de H₂O₂. A ce pH, le mélange du mutant K48I Fe²⁺ avec H₂O₂ oxyde lentement la protéine.

Si la concentration de H_2O_2 varie à pH 8.5, avec une concentration de SOR mutant K48I constante à $20\mu\text{M}$ la réaction est d'autant plus rapide que $[\text{H}_2\text{O}_2]$ augmente (Figure 130).

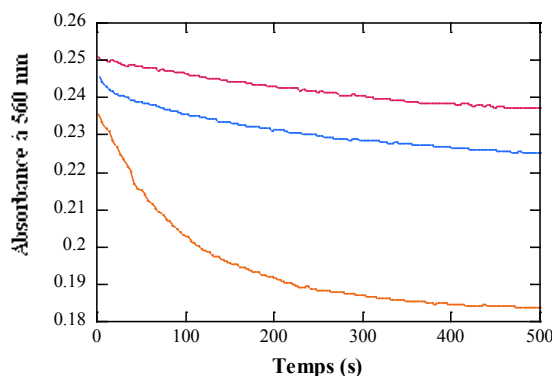
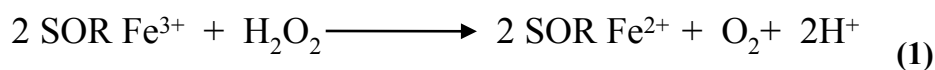


Figure 130 : Variation de l'absorbance à 560 nm après la réaction de $20\mu\text{M}$ du mutant K48I avec $10\mu\text{M}$ de H_2O_2 (rose), $20\mu\text{M}$ de H_2O_2 (bleu) et $100\mu\text{M}$ de H_2O_2 (orange) dans 10mM Tris/HCl pH 8.5.

La vitesse de la réaction dépend donc du pH et de la concentration initiale de H_2O_2 .

Afin de déterminer la stoechiométrie de la réaction, la réduction de K48I est étudiée en présence de concentration de H_2O_2 variant de 0.25 à 2 équivalents de SOR. 0.5 équivalent de H_2O_2 par rapport à la quantité de SOR K48I oxydée permet de réduire la totalité de la protéine. Le potentiel redox du couple $\text{O}_2^{\cdot-}, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ est $+940\text{mV/ENH}$ à pH 7.0, celui du couple $\text{O}_2, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ est de $+270\text{mV/ENH}$ à pH 7.0 (Koppenol, 1989). Dans le premier cas, la réduction est à 1 électron, dans le second à 2. Le couple $\text{O}_2, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ a un potentiel trop élevé pour pouvoir réduire la SOR oxydée. Le couple $\text{O}_2, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$ a un potentiel beaucoup plus réducteur pouvant réduire le site actif ($+370\text{mV/ENH}$ (Nivière et coll, 2004)). De plus, au sein de ce couple, H_2O_2 est un réducteur à deux électrons ce qui concorde avec la stoechiométrie observée pour la réduction de la SOR K48I par H_2O_2 . Le mutant SOR K48I semble donc être réduit à 2 électrons par H_2O_2 et doit donc conduire à la formation de dioxygène (réaction 1).



Afin de vérifier cette hypothèse, la quantité d' O_2 formée au cours de la réduction de la SOR par H_2O_2 est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark. Dans une solution de 1mL de 2mM Tris/HCl pH 8.5 sous azote, $150\mu\text{M}$ de SOR K48I sont ajoutés et laissés équilibrer quelques minutes, $150\mu\text{M}$ H_2O_2 sont alors ajoutés. Dans ces conditions, l'électrode de Clark mesure l'apparition de dioxygène qui se forme en environ 6 minutes (Figure 131).

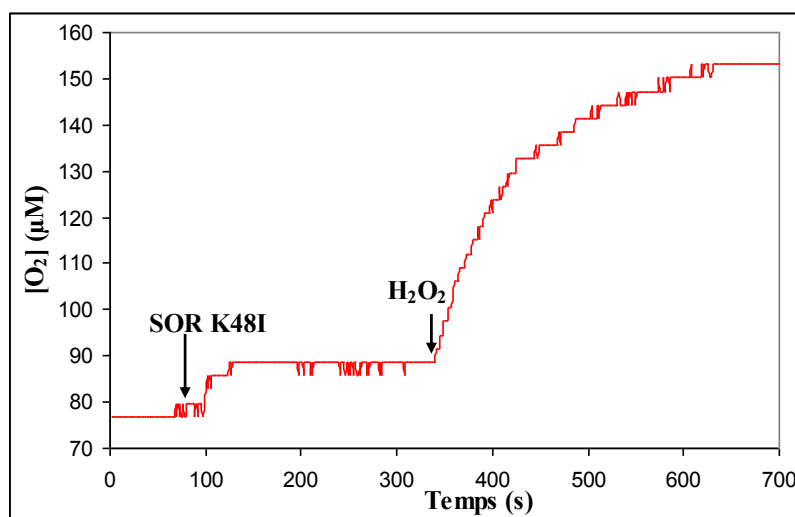
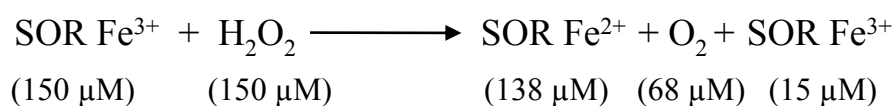


Figure 131 : Variation de la quantité de O_2 au cours de la réaction de la SOR K48I ($150 \mu M$) avec H_2O_2 ($150 \mu M$), mesuré par électrode de Clark dans $2 \text{ mM Tris/HCl pH } 8.5$.

Les données obtenues par l'électrode de Clark montrent qu'au cours de la réaction $68 \mu M$ de O_2 ont été formés (Figure 131). Afin de pouvoir établir le bilan global de la réaction, la quantité de SOR réduite en fin de réaction est mesurée en UV-visible par réoxydation chimique au chlorure d'iridium. Nous avons alors le bilan suivant :



Si la même expérience est réalisée en absence de protéine, une faible production de $15 \mu M$ d' O_2 est observée sur le même temps, dans les mêmes conditions. Ainsi ces données vérifient que la SOR est bien réduite à 2 électrons par H_2O_2 comme décrit dans la réaction (1).

Nous recommençons l'expérience à différentes concentrations de SOR, il y a toujours deux fois moins de dioxygène généré que de SOR K48I réduite. Ainsi la SOR K48I est bien réduite par H_2O_2 selon la réaction (1).

Annexe 9

Photochemical processes associated with the intermediates formed during the reaction of superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide

Florence Bonnot ^a, Chantal Houée-Levin ^b, Vincent Favaudon ^c, Vincent Nivière ^{a,*}

^a Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV-CEA Grenoble/CNRS/Université Joseph Fourier, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

^b Laboratoire de Chimie Physique, UMR8000 CNRS/Université Paris-Sud, Bâtiment 350, Centre Universitaire 91405 Orsay Cedex, France

^c Inserm Unité 612 and Institut Curie, Bâtiment 110-112, Centre Universitaire 91405 Orsay Cedex, France

* Corresponding author. Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV-CEA Grenoble/CNRS/Université Joseph Fourier, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Tel: 33 4 38 78 91 09; Fax: 33 4 38 78 91 24 ; E.mail: vniviere@cea.fr

Keywords: superoxide reductase, pulse radiolysis, reaction intermediates, photochemical processes, *Desulfoarculus baarsii*.

Abbreviations. SOR, superoxide reductase; SOD, superoxide dismutase.

Abstract

Superoxide reductase SOR is an enzyme involved in superoxide detoxification in some microorganisms. Its active site consists of a non-heme ferrous center in an unusual $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})_1]$ square pyramidal pentacoordination that efficiently reduces superoxide into hydrogen peroxide. In previous works, the reaction mechanism of the SOR from *Desulfoarculus baarsii* enzyme, studied by pulse radiolysis, was shown to involve the formation of two reaction intermediates T1 and T2. However, the absorption spectrum of T2 was reported with an unusual sharp band at 625 nm, very different from that reported for other SORs. In this work, we show that the sharp band at 625 nm observed by pulse radiolysis reflects the presence of photochemical processes that occurs at the level of the transient species formed during the reaction of SOR with superoxide. These processes do not change the stoichiometry of the global reaction. These data highlight remarkable photochemical properties for these reaction intermediates, not previously suspected for iron-peroxide species formed in the SOR active site. We have reinvestigated the reaction mechanism of the SOR from *Desulfoarculus baarsii* by pulse radiolysis in the absence of these photochemical processes. The T1 and T2 intermediates now appear to have absorption spectra similar to those reported for the *Archaeoglobus fulgidus* SOR enzymes. Although for some enzymes of the family only one transient was reported, on the whole, the reaction mechanisms of the different SORs studied so far seem very similar, which is in agreement with the strong sequence and structure homologies of their active sites.

1. Introduction

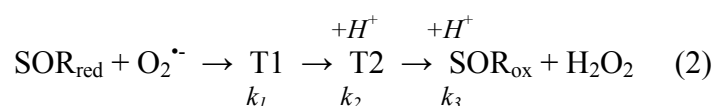
Superoxide radical, $O_2^{\bullet-}$, is at the same time a very toxic by-product and a defence agent coming from the oxygen metabolism. It forms from the adventitious one electron reduction of O_2 at the level of the respiratory chain, by autooxidation of some small molecules or protein cofactors and by the NADPH oxidase system [1, 2]. Cells possess very efficient enzymatic systems that can regulate the steady state of superoxide radicals [1, 2]. For decades, it was thought that superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the disproportionation of superoxide into H_2O_2 and O_2 , was the only existing superoxide detoxification enzyme. More recently, it has been discovered that some anaerobic or microaerophilic bacteria use a totally different enzyme system to detoxify superoxide. The enzyme was called superoxide reductase (SOR), which catalyzes the one-electron reduction of $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 [3-8]:



SORs are non-heme iron proteins that can be classified into one-iron proteins, which contain only the iron active-site center (Center II) [3, 5, 9, 10] or two-iron proteins [4, 6, 11], which possess an additional rubredoxin-like $[Fe^{3+}-(SCys)_4]$, center (Center I), apparently not involved in catalysis [12]. The SOR active site consists of a non-heme Fe^{2+} center in an unusual $[Fe(NHis)_4(SCys)_1]$ square pyramidal pentacoordination [13, 14], with a vacant coordination position. It reacts specifically at nearly diffusion-controlled rates with $O_2^{\bullet-}$ and, according to an inner sphere $O_2^{\bullet-}$ reduction mechanism, leads to H_2O_2 as final product. The resulting ferric active site becomes hexacoordinated after binding to the carboxylate side chain of a well conserved glutamate residue [13, 15] and can be regenerated into its reduced and active form by cellular reductases, allowing turn-overs with superoxide [16]. Different groups have investigated the reaction mechanism of SOR with superoxide by rapid kinetics,

mainly using pulse radiolysis technique [6, 11, 17-22]. Although one or two reaction intermediates have been proposed depending on the enzyme studied, it is now generally accepted that at least one transient species is a Fe^{3+} -peroxide species. This is strongly supported by studies on SOR variants, which stabilize these iron-peroxide species and have allowed their detailed characterization by Resonance Raman spectroscopies [23-25] and X-ray diffractions techniques [26].

The SOR from *Desulfoarculus baarsii* enzyme has been studied by pulse radiolysis and the reaction mechanism was proposed to involve the formation of two intermediates T1 and T2 [17, 19, 25].



The first transient T1 presents an absorption spectrum very similar to that reported on other SORs and was described as a Fe^{3+} -peroxo species ($\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^\cdot$), resulting from the bimolecular reaction of $\text{O}_2^{\bullet-}$ with Fe^{2+} . T2 is formed after a protonation of T1, thus it was proposed to be a Fe^{3+} -hydroperoxo species ($\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$). Conversely to other SORs, the absorption spectrum of T2 in the *D. baarsii* enzyme seemed to involve a sharp band at 625 nm very different from that reported for other SORs. Finally, T2 was proposed to undergo a second protonation process to generate H_2O_2 and the Fe^{3+} final species [19, 25].

In this work, we show that for the *D. baarsii* enzyme the sharp band at 625 nm observed by pulse radiolysis reflects the presence of a photochemical process that occurs at the level of a transient species formed during the reaction of SOR with $\text{O}_2^{\bullet-}$. We have reinvestigated the reaction mechanism of the SOR from *D. baarsii* by pulse radiolysis in the absence of this photochemical process.

2. Materials and methods

2.1. Protein expression and purification

Overexpression and purification of the recombinant SOR wild-type from *D. baarsii* was carried out as reported in [4]. The protein was isolated with a fully oxidized Center I ($\epsilon_{503\text{nm}} = 4,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and a fully reduced Center II. Center II can be fully oxidized ($\epsilon_{644\text{nm}} = 1,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) with a slight stoichiometric excess of K_2IrCl_6 [19].

2.2. Pulse radiolysis and spectrophotometric experiments

Pulse radiolysis measurements were performed as described elsewhere [27]. Sodium formate and buffers were of the highest quality available. Oxygen was from ALPHA GAZ, with purity higher than 99.99%. Water was purified using a Millipore Milli-Q system (resistivity 18.2 M Ω). Briefly, free radicals were generated by irradiation of O_2 -saturated aqueous protein solutions (100 μM), in 2 mM buffer, 10 mM sodium formate with 0.2-2 μs pulses of 4 MeV electrons at the linear accelerator at the Curie Institute, Orsay, France. Superoxide anion, $\text{O}_2^{\bullet-}$, was generated during the scavenging by formate of the radiolytically produced hydroxyl radical, HO^{\bullet} , as previously described [28]. The doses per pulse were calibrated from the absorption of the thiocyanate radical $(\text{SCN})_2^{\bullet-}$ obtained by radiolysis of the thiocyanate ion solution in N_2O -saturated phosphate buffer ($[\text{SCN}^-] = 10^{-2} \text{ M}$ in 10 mM phosphate, pH 7, $G((\text{SCN})_2^{\bullet-}) = 0.55 \mu\text{mol. J}^{-1}$, $\epsilon_{472 \text{ nm}} = 7580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [29]. The dose varies linearly with the pulse length, for instance a dose of *ca.* 5 Gy per pulse (0.2 μs long) resulted in *ca.* 2.8 μM of $\text{O}_2^{\bullet-}$. Reactions were followed spectrophotometrically, using an Hamamatsu SuperQuiet Xenon-Mercury lamp (150 W, between 310 and 750 nm) or a tungsten lamp

(between 450 and 750 nm), at 20 °C in a 2 cm path length fused silica cuvette. The Xenon lamp was not submitted to a surtension to increase its power. A cut-off filter cutting all wavelengths below 310, 345, 395, 425 or 530 nm, was positioned between the lamp and the cuvette. Kinetic traces were analyzed using a Levenberg-Marquardt algorithm from the Kaleidagraph[®] software package (Synergy Software). The absorption spectrum of T2 was calculated from the double exponential fits of the kinetic traces between 0.3 and 30 ms at different wavelengths: $A = A_1 \exp(-k_2 * t) + A_2 \exp(-k_3 * t) + A_3$, where : A, absorbance at time t; A_1 and A_2 , pre-exponential terms which describe the amplitude of each phase with k_2 and k_3 values fixed at 255 and 110 s⁻¹, respectively; A_3 , absorbance at the end of the reaction. $A_2 + A_3$ corresponds to the absorbance of T2 at a specific wavelength.

Optical absorbance measurements were made using a Varian Cary spectrophotometer, in 1 cm path length cuvette. Light-induced absorbance changes (flash photolysis) were measured with a laboratory-built spectrophotometer similar to the one developed by Joliot *et al* [30]. The absorption level is sampled using 2 µs monochromatic Xenon flashes given from 1 ms to several seconds after actinic excitation.

2.3. Analytical experiments

Electrospray ionization mass spectra were obtained on a Perkin-Elmer Sciex API III+ triple quadrupole mass spectrometer equipped with a nebulizer-assisted electrospray source operating at atmospheric pressure. Samples were in 10 mM ammonium acetate.

Hydrogen peroxide production was determined immediately after the pulse radiolysis using the leuco crystal violet horseradish peroxidase method as described in [31].

3. Results

3.1. Photochemical processes associated with the pulse radiolysis experiments

The reaction mechanism of the SOR from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide has been previously investigated by pulse radiolysis, using a Xenon lamp to detect the very fast SOR absorbance variations during its reaction with superoxide [17, 19, 25], which is a common procedure. In all these studies, a 310 nm cut-off filter was positioned between the lamp and the UV-vis cuvette containing the SOR sample in order to prevent possible alteration of aromatic amino acid residues during the measure.

Here, similar pulse radiolysis experiments with the SOR from *Desulfoarculus baarsii* were repeated at pH 7.6, but with various cut-off filters, cutting below 345, 395, 425 or 530 nm, between the Xenon lamp and the cuvette. The kinetics of the formation of the first reaction intermediate T1 remained unchanged whatever the filters. It is second order with respect to SOR and superoxide, with a rate constant $k_I = (1.0 \pm 0.2) 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (data not shown). As shown in Figure 1, with the 345 nm filter, the absorption spectrum of T1 between 330 and 670 nm still exhibits a broad absorbance band centered at 600 nm, with a similar shape to that of the first intermediate obtained with the 310 nm filter. However with the 345 nm filter, T1 presents a 1.6 fold lower epsilon value at 600 nm compared to that obtained with the 310 nm filter.

Surprisingly, in the presence of the 345, 395, 425 or 530 nm filters, the amplitudes and the kinetics of the traces recorded at longer timescales corresponding to the decay of T1 are modified compared to those obtained with the 310 nm filter (Figure 2 and not shown). These modifications are visible at various wavelengths in the range of 600 to 650 nm. The effects of

the 345 nm or above filters (395, 425 or 530 nm filters) are identical at all the wavelengths studied every 5 to 10 nm between 400 and 720 nm (Figure 2 and data not shown) and in the following are presented only the experiments carried out in the presence of the 345 nm filter.

As previously reported, in the presence of the 310 nm filter, at all the wavelength investigated between 450 and 700 nm, the decay of the first intermediate was found to be monoexponential, with a rate constant of 500 s^{-1} at pH 7.6, to form a second reaction intermediate exhibiting a sharp absorption band at 625 nm ([19] and Figure 3). Now, in the presence of the 345 nm filter, the decay of T1 is more complex with two phases. The amplitude of these two phases are clearly visible using pulses generating $9\text{ }\mu\text{M}$ of $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figure 2). All the traces between 450 and 650 nm could be adjusted with a biexponential model with rate constants of $255 \pm 27\text{ s}^{-1}$ (k_2) and $110 \pm 24\text{ s}^{-1}$ (k_3), respectively (Figure 2). Both rate constants k_2 and k_3 were found to be independent of SOR concentration (data not shown). These data suggest that in the presence of the 345 nm filter, the decay of T1 conduces to the formation of two successive species T2 and T3. The absorption spectrum of T2, which cannot be experimentally determined since T2 evolves toward T3 before its maximal formation, was reconstituted by an extrapolation of the decay of T1 using the double exponential fits of the kinetic traces at different wavelengths. As shown in Figure 3, T2 exhibits a broad band centered at about 570 nm, which looks like the spectrum of an oxidized SOR in basic medium corresponding to a $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ species [32]. The absorption spectrum of T3, which is formed maximally 20 ms after the beginning of the reaction, can be reconstructed directly from the observed absorption value at the different wavelengths. As shown in Figure 3, this spectrum is identical to that of SOR oxidized by superoxide $9\text{ }\mu\text{M}$. It does not exhibit the sharp absorbance band centered at 625 nm observed with the 310 nm filter. These data show that in the presence of the 345 nm filter, T3 is the final expected reaction product, *i. e.* ferric SOR, resulting from a stoichiometric oxidation of SOR by $\text{O}_2^{\bullet-}$.

These results suggest that the sharp absorption band at 625 nm observed at the level of T2 during the reaction time of SOR with superoxide in the presence of the 310 nm filter can be directly associated with the Xenon lamp illumination, at wavelengths between 310 and 345 nm. This thin band might arise from a photochemical process induced by the Xenon lamp, which targets a sensitive absorption band in the region 310-345 nm.

3.2. Reaction products in the presence or absence of the photochemical process

In order to determine if the photochemical process observed during the pulse radiolysis experiments induces some modifications on the overall reaction, a SOR solution was allowed to react with 16.5 μM of superoxide produced by pulse radiolysis (26.5 Gy) and illuminated with the Xenon lamp. An absorption spectrum of the solution was taken within a minute after the pulse with a classical UV-vis spectrophotometer. A catalytical amount of catalase was added to the solution before the pulse in order to avoid any possible oxidation of SOR by H_2O_2 generated at the end of the reaction. In all cases, in the presence of the 310 or 345 nm cut off filters, the solution exhibited the final spectrum characteristic of an oxidized SOR at 16.5 μM (band at 644 nm), in agreement with a stoichiometric oxidation of SOR by $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figure 3). This oxidized SOR was still redox active since it could be reversibly reduced and re-oxidized with stoichiometric amounts of ascorbate and iridium chloride, respectively (data not shown). In addition, electrospray mass spectra analysis of SOR did not reveal any alteration of the mass of the SOR polypeptide chain whatever the presence of a 310 or a 345 nm cut-off filter in the pulse radiolysis experiments ($14,022 \pm 2$ Da, data not shown).

Quantification of H_2O_2 production immediately after the pulse was carried out in similar experimental conditions, except that no catalase was present in the pulsed solutions. Irradiation of aqueous solutions always leads to some H_2O_2 production during the primary steps of water radiolysis ($G \approx 0.07 \mu\text{mol J}^{-1}$) [33]. Here the dose was equal to 26.5 Gy, hence

the radiolytic $[H_2O_2]$ was equal to $1.8 \mu M$. Taking into account the correction of the radiolytic H_2O_2 , in the presence of the 310 or the 345 nm cut off filter, 10.5 ± 1.2 or $13.6 \pm 0.3 \mu M$ of H_2O_2 were detected immediately after the pulse, respectively. These data suggest that in the presence of the 345 nm filter, H_2O_2 quantification fits quite well to the expected value for a stoichiometric oxidation of SOR by $O_2^{\bullet -}$ ($16.5 \mu M$)¹. In the presence of the 310 nm filter, the H_2O_2 production is slightly lower, but still indicates that most of the superoxide reacting with SOR is converted into H_2O_2 .

On the whole, these data show that the photochemical process observed during the reaction cycle of SOR can be associated to a transient photoproduct (absorbance band at 625 nm) which does not markedly affect the overall reaction of SOR with $O_2^{\bullet -}$.

3.3. Photochemical properties of the SOR reaction intermediates

In order to determine if the photochemical process can be specifically associated with a SOR transient or with SOR by itself, the following experiments were carried out.

First, the pulse radiolysis experiments were realised with increasing radiation doses to generate 3, 5 or $9 \mu M$ of superoxide, in the presence of an excess of SOR with the 310 or 345 nm filter. The absorbance was recorded at 625 nm 20 ms after the pulse (maximum of the sharp absorption band). The 625 nm absorbance values were found to be directly proportional to the amount of superoxide generated by pulse radiolysis in both cases (Figure 4). As shown in Figure 4, the slope is higher with the filter cutting off at 310 nm compared to that with the filter at 345 nm, reflecting a higher ϵ value at 625 nm for the species formed in the presence of that filter. No absorbance variations at 625 nm were observed in the absence of SOR. These data confirm that the 625 nm sharp band is associated with the reaction of SOR with superoxide.

¹ The precision on the irradiation doses are $\pm 10 \%$.

Second, as a control, flash photolysis experiments with a Xenon lamp on both the ferrous and ferric forms of SOR, in the absence of superoxide, were carried out. A SOR sample (10 μ M SOR, 10 mM formate, 10 mM Tris/HCl pH 7.6) was irradiated with a pulsed Xenon lamp in the presence of three different cut-off filters at 305, 345 and 390 nm. The signal was recorded at 625 nm as a function of time, 1 ms after the Xenon flash and up to 1 s. For the ferrous SOR as well as the ferric SOR tested by flash photolysis with cut-off filters at 305, 345 and 390 nm, no signals were detected at 625 nm between 1 ms to 1 s after the Xenon flash (data not shown). These data support the fact that the stable ferrous and ferric forms of SOR are not at the origin of the photochemical process observed during the pulse radiolysis experiments. Consequently, the photochemical process can be specifically associated with an intermediate formed during the reaction of SOR with superoxide.

3.4. Effect of the lamp, Xenon/tungsten, on the photochemical process

The pulse radiolysis experiments have been repeated with a tungsten lamp instead of the Xenon one². Whereas the Xenon lamp emits down to 250 nm, the emission spectrum of the tungsten lamp strongly decreases below 500 nm. With the tungsten lamp, the kinetic traces are not affected by the presence or the absence of the 310 to 425 nm cut off filters (data not shown) and are identical to those obtained with the Xenon lamp in the presence of the 345 nm and above filters. The spectrum of the final species reconstructed at 20 ms reaction time was identical to that obtained with the Xenon lamp in the presence of the 345 to 425 cut off filters (data not shown). These data are in agreement with a photochemical process that concerns only the transient species that exhibits absorption band(s) peaking below 345 nm.

² With the tungsten lamp, which is less intense than the Xenon lamp, the short time kinetics (0-500 μ s) cannot be investigated. Consequently this lamp is used only to follow kinetics above 0.5-1 ms, which in the case of SOR correspond to those described by the rate constants k_2 and k_3 . These are common procedures in pulse radiolysis experiments.

4. Discussion

The interpretation of the rapid kinetic data obtained by pulse radiolysis on SOR are essentially based on the characterisation of the spectra of the different reactions intermediates formed during one turn over reaction of SOR with superoxide. Three different groups, including ours, have investigated the reaction mechanism of SOR with superoxide by pulse radiolysis. Depending on the origin of SOR, one or two reaction intermediates have been observed [6, 11, 17-21, 25]. In all the studies published so far, the spectra of the first observed reaction intermediate are very similar, with a broad band centered at 600-610 nm. This intermediate T1 was generally proposed to be a ferric iron (hydro)peroxo species, resulting from the fast binding of superoxide to the sixth open coordination sphere of the ferrous iron with simultaneous electron transfer to the superoxide adduct. Afterwards, depending on the enzyme studied, different observations have been made, suggesting that different reaction mechanisms could exist among SOR enzymes. In the case of the enzymes from *Archaeoglobus fulgidus*, a second reaction intermediate T2 has been observed and from its absorption spectrum was convincingly attributed to a Fe^{3+} -OH species [11, 20]. This Fe^{3+} -OH species would result from a nucleophilic attack of a water molecule to the iron hydroperoxide species to generate the reaction product H_2O_2 . In a last phase, the carboxylate side chain of the well conserved Glu47 residue would bind to the iron in place of the hydroxide ligand to make the resting ferric state of the enzyme. In the case of the SOR from *D. vulgaris*, no evidence for the formation of a second reaction intermediate was reported and the iron peroxide intermediate species T1 is apparently directly transformed to the ferric-Glu SOR species and H_2O_2 product [6, 18]. In the case of the enzyme from *D. baarsii*, a second intermediate was also observed. However, it exhibited a different spectrum than that characterized for the *A. fulgidus* enzymes, with a remarkable sharp absorption band at 625 nm

[19, 25]. These data suggested that for these two enzymes, the second reaction intermediates could be different species.

In our present study, we have shown that for the *D. baarsii* enzyme, the sharp absorption band at 625 nm observed at the level of the second transient is not mechanistically informative but results from a photochemical process induced by an excitation due to the Xenon lamp in the 310-345 nm region. This was shown using different filters between the Xenon lamp and the SOR sample. This sharp band is associated neither with an instrumental artifact nor to the fully reduced/oxidized enzyme but results from specific electronic properties of SOR reaction intermediates and could only be photo-induced by irradiation of a transient at wavelengths below 350 nm. It was demonstrated by the following experiments. i) Pulse radiolysis of a solution without SOR does not present any absorption band in the 625 nm region, ruling out any instrumental origin for that band. ii) As shown by flash photolysis experiments, SOR alone in its ferrous or ferric state does not conduce to the formation of transient absorption band at 625 nm when irradiated with a Xenon lamp. iii) The intensity of the sharp absorption band at 625 nm is directly proportional to the amount of superoxide that reacts with an excess of ferrous SOR. Both reaction intermediates T1 and T2 are affected by a photochemical process, however the spectrum of T1 is modified to a lower extent. Its extinction coefficient at the maximum of the absorption spectrum (600 nm) is lowered by a factor of 1.6 in the presence of the 345 nm filter compared to the 310 nm filter.

Although at this stage it is difficult to determine the exact physical basis for these photochemical processes, it appears that the SOR reaction intermediates possess sensitive absorption bands in the 310-345 nm region (Figures 1 and 3), which are most likely at the origin of the photochemical processes. In any cases, this study highlights remarkable photochemical properties for these reaction intermediates, which were not previously suspected for iron-peroxide species formed at the SOR active site. Interestingly, the end products remain the same in the presence or in the absence of these photochemical processes

and the reaction is always consistent with a stoichiometric reduction of superoxide by SOR. Then, these photochemical processes do not modify the overall reaction mechanism of SOR, being transient and without direct chemical reactivity.

In the absence of these photochemical processes (with the 345 nm filter)³, analysis of the reaction of SOR with superoxide still reveals the presence of two reaction intermediates T1 and T2, T2 coming from the decay of T1, with absorbance properties different from those described in the presence of the 310 nm filter. T2 is finally converted to the final product, the ferric SOR, as shown in equation 2. The values of the rate constants for the formation of T2 (k_2) and its decays (k_3) are very close to each other, 255 and 110 s⁻¹ respectively at pH 7.6, and consequently T2 spectrum was determined by extrapolations of the kinetic traces (Figure 3). From the results presented here, in the absence of any photochemical process, the reaction mechanism of SOR from *D. baarsii* appears now similar to that reported for the two enzymes from *A. fulgidus*, with formation of a T2 intermediate associated with a Fe³⁺-OH species [11, 20]. One should note that at pH 7.6, for the two enzymes from *A. fulgidus*, k_2 and k_3 are respectively equal to 3800 and 25 s⁻¹ whereas in *D. baarsii*, they are 255 and 110 s⁻¹. In the case of the *D. vulgaris* enzyme, which has strong sequence homology with the *D. baarsii* one, a T2 intermediate was not observed and T1 apparently converts directly to the final oxidized SOR [18]. However, it is possible that in this latter case, a T2 intermediate also exists with however k_3 much higher than k_2 . In this case, the step described by k_2 would be rate limiting and T2 concentration would be very low and not detectable. Then, it is conceivable that the SOR from *D. vulgaris* exhibits a similar reaction mechanism than that of the enzymes from *A. fulgidus* and *D. baarsii*.

³ The fact that photochemical processes were observed by pulse radiolysis in the case of the *D. baarsii* enzyme, but not with the *A. fulgidus* and *D. vulgaris* enzymes by different groups could be explained by the following. For instance, the pulse radiolysis devices can be equipped with either Xenon or tungsten lamps and with different filters between the lamp and the sample to be analyzed. These informations are usually not reported in the Materials and Methods section and in general it is not specified which lamp and which filter have been used in each specific pulse radiolysis experiment.

In conclusion, the reaction investigated in the absence of photochemical processes for the *D. baarsii* enzyme reveals the formation of a second intermediate which seems similar to that reported for the *A. fulgidus* enzymes. The data suggest that the reaction mechanism of the different SORs studied so far are very similar, which is in agreement with the strong sequence and structure homologies of their active sites. We are currently reinvestigating the reaction mechanism of the different SOR mutants from *D. baarsii*, E47A, K48I and E114A, in the absence of photochemical process.

Aknowledgments

We are grateful to Dr. André Verméglio (CEA-Cadarache, DEVM, Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire, France) for the flash photolysis experiments and Izabel Bérard (LSMP, IBS-Grenoble, France) for electrospray mass spectra.

References

- [1] J.A. Imlay, Cellular defences against superoxide and hydrogen peroxide, *Ann. Rev. Biochem.* 77 (2008) 755-776.
- [2] C.C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 278-286.
- [3] F.E. Jenney Jr., M.F.J.M. Verhagen, X. Cui, M.W.W. Adams, Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase, *Science* 286 (1999) 306-309.
- [4] M. Lombard, M. Fontecave, D. Touati, V. Nivière, Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 115-121.
- [5] I.A. Abreu, L.M. Saraiva, J. Carita, H. Huber, K.O. Stetter, D.E. Cabelli, M. Teixeira, Oxygen detoxification in the strict anaerobic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*: superoxide scavenging by neelaredoxin, *Mol. Microb.* 38 (2000) 322-334.

- [6] E.D. Coulter, J.P. Emerson, D.M. Kurtz Jr., D.E. Cabelli, Superoxide reactivity of rubredoxin oxidoreductase (desulfoferrodoxin) from *Desulfovibrio vulgaris*: a pulse radiolysis study, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 11555-11556.
- [7] V. Nivière, M. Fontecave, Discovery of superoxide reductase: an historical perspective, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 119-123.
- [8] D.M. Kurtz Jr., Microbial detoxification of superoxide: the non-heme iron reductive paradigm for combating oxidative stress, *Acc. Chem. Res.* 37 (2004) 902-908.
- [9] T. Jovanovic, C. Ascenso, K.R.O. Hazlett, R. Sikkink, C. Krebs, R. Litwiller, L.M. Benson, I. Moura, J.J.G. Moura, J.D. Radolf, B. Huynh, S. Naylor, F. Rusnak, Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28439-28448.
- [10] M. Lombard, D. Touati, M. Fontecave, V. Nivière, Superoxide reductase as a unique defence system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27021-27026.
- [11] J.V. Rodrigues, L.M. Saraiva, I.A. Abreu, M. Teixeira, D.E. Cabelli, Superoxide reduction by *Archaeoglobus fulgidus* desulfoferrodoxin: comparison with neelaredoxin, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 248-256.
- [12] J.P. Emerson, D.E. Cabelli, D.M. Kurtz Jr., An engineered two-iron superoxide reductase lacking the [Fe(SCys)₄] site retains its catalytic properties in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 100 (2003) 3802-3807.
- [13] A.P. Yeh, Y. Hu, F.E. Jenney Jr., M.W.W. Adams, D.C. Rees, Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states, *Biochemistry* 39 (2000) 2499-2508.

- [14] V. Adams, A. Royant, V. Nivière, F.P. Molina-Heredia, D. Bourgeois, Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction, *Structure* 12 (2004) 1729-1740.
- [15] C. Berthomieu, F. Dupeyrat, M. Fontecave, A. Verméglio, V. Nivière, Redox-dependent structural changes in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* and *Treponema pallidum*: a FTIR study, *Biochemistry* 41 (2002) 10360-10368.
- [16] J.P. Emerson, E.D. Coulter, R.S. Phillips, D.M. Kurtz Jr., Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39662-39668.
- [17] M. Lombard, C. Houée-Levin, D. Touati, M. Fontecave, V. Nivière, Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*: reaction mechanism and role of glutamate 47 and lysine 48 in catalysis, *Biochemistry* 40 (2001) 5032-5040.
- [18] J.P. Emerson, E.D. Coulter, D.E. Cabelli, R.S. Phillips, D.M. Kurtz Jr., Kinetics and mechanism of superoxide reduction by two-iron superoxide reductase from *Desulfovibrio vulgaris*, *Biochemistry* 41 (2002) 4348-4357.
- [19] V. Nivière, M. Asso, C.O. Weill, M. Lombard, B. Guigliarelli, V. Favaudon, C. Houée-Levin, Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*: identification of protonation steps in the enzymatic mechanism, *Biochemistry* 43 (2004) 808-818.
- [20] J.V. Rodrigues, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, M. Teixeira, Superoxide reduction mechanism of *Archaeoglobus fulgidus* one-iron superoxide reductase, *Biochemistry* 45 (2006) 9266-9278.
- [21] V. Nivière, M. Lombard, M. Fontecave, C. Houée-Levin, Pulse radiolysis studies on superoxide reductase from *Treponema pallidum*, *FEBS Lett.* 497 (2001) 171-173.

- [22] V.W. Huang, J.P. Emerson, D.M. Kurtz Jr., Reaction of *Desulfovibrio vulgaris* two-iron superoxide reductase with superoxide: insights from stopped-flow spectrophotometry, *Biochemistry* 46 (2007) 11342-11351.
- [23] C. Mathé, T.A. Mattioli, O. Horner, M. Lombard, J.M. Latour, M. Fontecave, V. Nivière, Identification of iron(III) peroxo species in the active site of the superoxide reductase SOR from *Desulfoarculus baarsii*, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4966-4967.
- [24] C. Mathé, V. Nivière, T.A. Mattioli, Fe^{3+} - η_2 -peroxo species in superoxide reductase from *Treponema pallidum*. Comparison with *Desulfoarculus baarsii*, *Biophys. Chem.* 119 (2006) 38-48.
- [25] C. Mathé, C.O. Weill, T.A. Mattioli, C. Berthomieu, C. Houée-Levin, E. Tremey, V. Nivière, Assessing the role of the active-site cysteine ligand in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*, *J. Biol. Chem.* 282, (2007) 22207-22216.
- [26] G. Katona, P. Carpentier, V. Nivière, P. Amara, V. Adam, J. Ohana, N. Tsanov, D. Bourgeois, Raman-assisted crystallography reveals end-on peroxide intermediates in a nonheme iron enzyme, *Science* 316 (2007) 449-453.
- [27] V. Favaudon, H. Tourbez, C. Houée-Levin, J.M. Lhoste, CO_2^- radical induced cleavage of disulfide bonds in proteins. A gamma-ray and pulse radiolysis mechanistic investigation, *Biochemistry* 29 (1990) 10978-10989.
- [28] J.W.T. Spink, R.J. Wood, *An Introduction to Radiation Chemistry*, 3th edn. John Wiley & Son., 1990.
- [29] G.V. Buxton, C.R. Stuart, Reevaluation of the thiocyanate dosimeter for pulse-radiolysis, *J. Chem. Society-Faraday Trans.* 91 (1995) 279-281.
- [30] P. Joliot, D. Béal, B. Frilley, A new spectrophotometric method for the study of photosynthetic reactions, *J. Chem. Phys.* 777 (1980) 209-216.

- [31] H.A. Mottola, B.E. Simpson, G. Gorin, Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with Leuco crystal violet and peroxidase as catalyst, *Anal. Chem.* 40 (1970) 410–411.
- [32] C. Mathé, V. Nivière, T.A. Mattioli, Fe^{3+} -hydroxide ligation in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* is associated with pH dependent spectral changes, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 16436-16441.
- [33] C. Von Sonntag, *The Classical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London, 1987.

Figure Legends

Figure 1. Transient absorption spectrum of the first reaction intermediate formed 100 μ s after the beginning of the reaction of SOR (100 μ M in 10 mM formate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6) with $O_2^{\bullet-}$ (2.8 μ M), generated by pulse radiolysis. Xenon lamp, (●) with a 310 nm filter, (o) with a 345 nm filter.

Figure 2. Kinetic traces recorded at 625 nm during the reaction of the SOR from *D. baarsii* (100 μ M in 10 mM formate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6) with $O_2^{\bullet-}$ 9 μ M generated by pulse radiolysis, in the presence of the 310 nm filter (top) or the 345 nm filter (bottom) between the Xenon lamp and the SOR solution. The dashed lines were calculated for best fit to an exponential model (top) and to a biexponential model (bottom).

Figure 3. Transient absorption spectra, obtained with a Xenon lamp, of the reaction intermediates formed 3-20 ms after the beginning of the reaction of SOR (100 μ M in 10 mM formate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6) with $O_2^{\bullet-}$ (9 μ M), generated by pulse radiolysis. (●) T2 spectrum formed in the presence of a filter cutting off below 310 nm, 20 ms after the pulse. (Δ) T2 spectrum in the presence of a filter cutting off below 345 nm, calculated from an extrapolation of the decay of T1 using the double exponential fits of the kinetic traces at different wavelengths (o) T3 spectrum formed in the presence of a filter cutting off at 345 nm, 20 ms after the pulse. The solid line shows the spectrum of the solution recorded in an UV-vis spectrophotometer 1 min after the end of the pulse radiolysis reaction (20 μ M SOR in 10 mM formate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6, reacted with 16.5 μ M $O_2^{\bullet-}$), carried out with either a 310 or 354 nm filter and in the presence of 500 units/ml of catalase.

Figure 4. Variation of the absorption at 625 nm recorded 20 ms after the reaction of SOR from *D. baarsii* (100 μ M in 10 mM formate, 2 mM Tris/HCl pH 7.6) with increasing concentration of $O_2^{\bullet -}$ generated by pulse radiolysis. Xenon lamp with a 310 nm filter (●) or with a 345 nm filter (○).

Figure 1

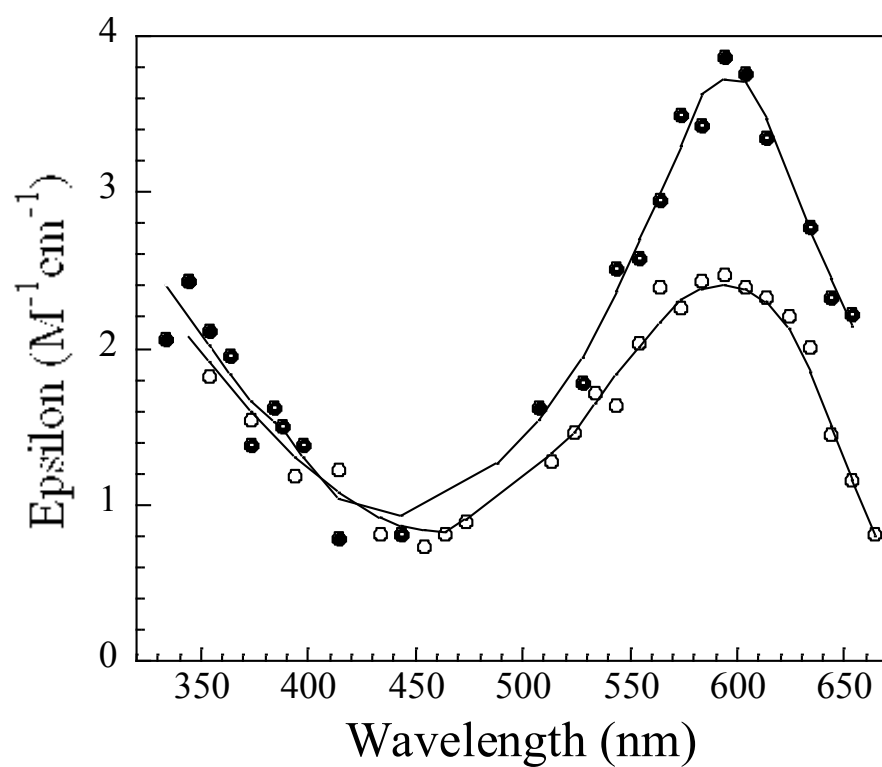


Figure 2

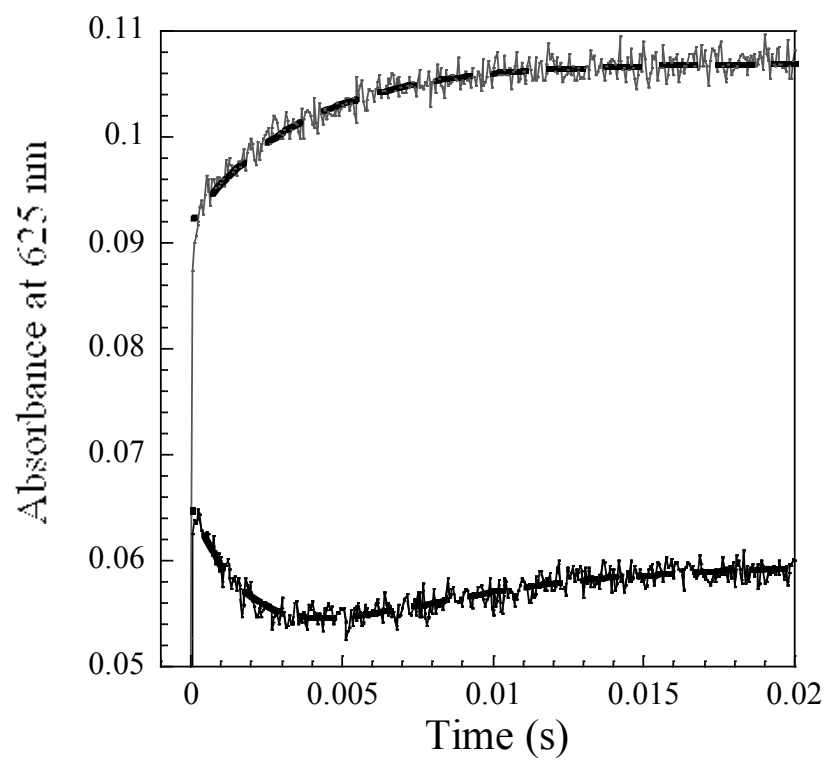


Figure 3

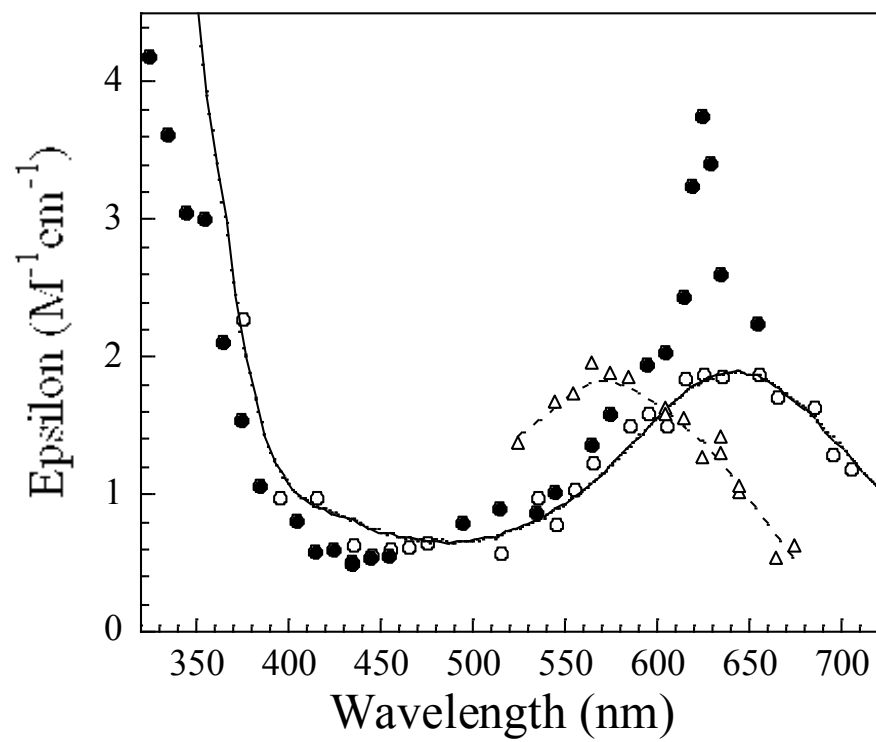
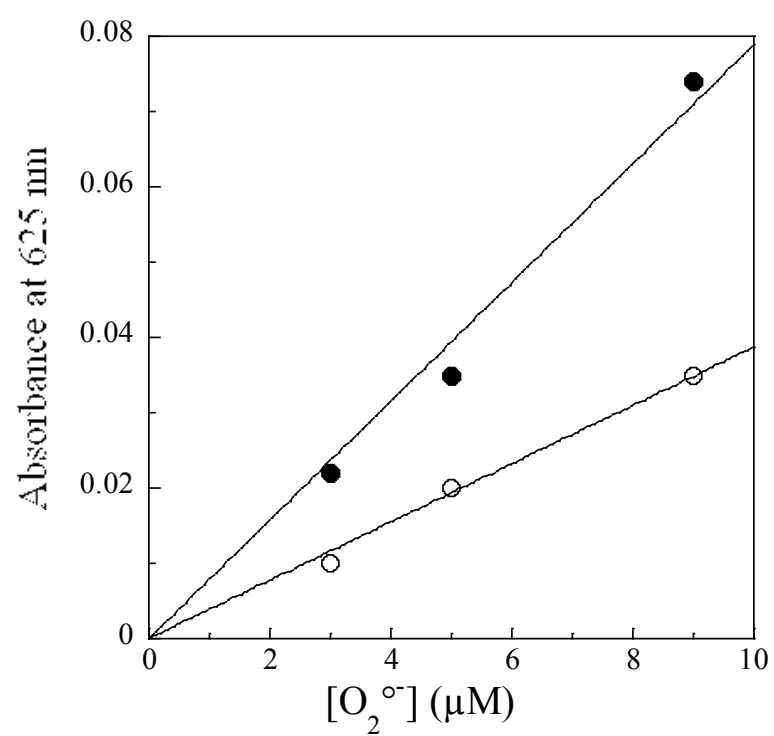


Figure 4



La superoxyde réductase (SOR) est une métalloprotéine qui catalyse la réduction du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Son site actif est constitué d'un centre mononucléaire de fer pentacoordiné tout à fait particulier de type [FeHisN₄CysS₁]. Pour son activité catalytique, la SOR nécessite des partenaires physiologiques comme donneurs d'électrons (réductases cellulaires). Les SORs de Classe 1, telle que celle de *Desulfoarcus baarsii*, possèdent en plus du site actif, un centre de type rubrédoxine [Fe(SCys)₄] qui ne réagit pas avec le superoxyde et dont la fonction est inconnue. Nous avons montré que ce centre rubrédoxine peut jouer un rôle de relais électronique entre les réductases et le site actif de la SOR. Cependant, ce transfert d'électron entre le centre rubrédoxine et le site actif ne se fait pas de façon intramoléculaire mais intermoléculaire, entre deux molécules de SOR. Nous proposons que la présence de ce centre permet à la SOR de s'adapter à une large gamme de réductases cellulaires et optimise ainsi l'activité de détoxification du superoxyde de la SOR.

Le mécanisme catalytique de la SOR a été très étudié par la technique de radiolyse pulsée. Nous montrons que les études antérieures sur la SOR de *D. baarsii* ont été perturbées par un phénomène photochimique, résultant d'une propriété particulière d'un des intermédiaires réactionnels du cycle catalytique. Les études du mécanisme de la SOR ont été reprises en absence de cet effet photochimique et nous ont permis de proposer un nouveau mécanisme réactionnel de réduction du superoxyde par la SOR de *D. baarsii*.

Nos études sur le mutant SOR K48I de *D. baarsii* nous ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel que joue la lysine 48 dans la protonation de l'intermédiaire réactionnel Fe³⁺-hydroperoxyde. En absence de cette lysine, nous avons observé une modification profonde de la réactivité de cet intermédiaire, qui ne conduit plus à la formation du produit de la réaction H₂O₂. Nous avons montré que l'espèce Fe³⁺-hydroperoxyde formée au sein de ce mutant est alors capable de réaliser des réactions d'oxydation spécifiques, telle la transformation de thioanisole en méthyl phényl sulfoxyde.

Nos données suggèrent fortement qu'en absence de cette lysine, l'intermédiaire Fe³⁺-hydroperoxyde évolue vers une espèce à haut degré d'oxydation de type fer-oxo, fortement oxydante, responsable de ces oxydations. Ainsi, la lysine 48 apparaît comme un résidu essentiel, qui permet à la SOR d'orienter l'évolution de l'intermédiaire Fe³⁺-hydroperoxyde vers la production de H₂O₂, plutôt que vers la formation d'entités de type fer-oxo à haut degré d'oxydation, comme le font les oxygénases de type cytochrome P450.

Mots Clés : Superoxyde, stress oxydant, radiolyse pulsée, anaérobie, superoxyde réductase, *Desulfoarcus baarsii*, fer hydroperoxyde.

Superoxide reductase (SOR) is a metalloprotein which catalyses the reduction of the radical superoxide into hydrogen peroxide. Its active site is constituted by a mononuclear iron center pentacoordinated [FeHisN₄CysS₁]. For its catalytic activity, SOR requires physiological partners as electron donor (cellular reductases). SORs of Class 1, such as that of *Desulfoarcus baarsii*, possess besides the active site, an additional iron center, rubredoxin [Fe(SCys)₄] type, which does not react with the superoxide and with an unknown function. We showed that this rubredoxin center plays a role of electronic relay between reductases and the active site of SOR. However, we show that this electron transfer between the rubredoxin center and the active site is not intramolecular but intermolecular, between two molecules of SOR. We propose that the presence of this iron center allows the SOR to adapt to various cellular reductases in order to optimize its detoxification activity.

The catalytic mechanism of the SOR had been studied by pulsed radiolysis. We show that the previous studies on the SOR from *D. baarsii* were perturbed by a photochemical phenomenon, resulting from a particular property of one of the key reaction intermediates of the catalytic cycle. The reaction mechanism has been reinvestigated in the absence of this photochemical effect and allowed us to propose a new reaction mechanism of reduction of the superoxide by the SOR of *D. baarsii*.

Our studies on the SOR mutant K48I of *D. baarsii* allowed us to bring to light the essential role of that lysine 48 in the protonation of the reaction intermediate Fe³⁺-hydroperoxyde. In absence of this lysine, we observed a modification of the reactivity of this reaction intermediate, which does not drive any more to the formation of the product of the reaction H₂O₂. We showed that the species Fe³⁺-hydroperoxyde formed within this mutant is then capable to carry out specific reactions of oxidation, such the transformation of thioanisole methyl phenyl sulfoxyde.

Our data strongly suggest that in absence of this lysine, the intermediate Fe³⁺-hydroperoxide evolves towards a high degree oxidation species, iron-oxo type, strongly oxidizing, responsible for these oxidations. So, the lysine 48 appears as an essential residue, which allows the SOR to direct the evolution of the intermediary Fe³⁺-hydroperoxyde to the production of H₂O₂, rather than to the formation of high-valent iron-oxo species, as observed in the cytochrome P450 oxygenases.